

Immunhistochemischer Nachweis des
muskarinischen Acetylcholinrezeptors M2
im Magen-Darm-Trakt der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Markus Leimbach
aus Dortmund

Gießen, 2013

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Herr Prof. Wolfgang Kummer

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer
2. Gutachter: PD Dr. M. Roderfeld

Tag der Disputation:
28.04.2014

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Histologischer Aufbau des Verdauungstraktes.....	1
1.1.1 Ösophagus	3
1.1.2 Magen	3
1.1.3 Dünndarm.....	4
1.1.4 Dickdarm	5
1.2 Das cholinerge System.....	6
1.2.1 Funktion des Acetylcholins im Verdauungstrakt.....	6
1.3 Muskarinische Rezeptoren	8
1.3.1 Einteilung und Aufbau von muskarinischen Rezeptoren.....	8
1.3.2 Vorkommen & Wirkung muskarinischer Rezeptoren im Verdauungstrakt.....	9
1.4 Fragestellung.....	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Versuchstiere.....	15
2.1.2 Primärantikörper.....	15
2.1.3 Sekundärreagenzien.....	16
2.1.4 Chemikalien	16
2.1.5 verwendete Lösungen	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 Gewebegewinnung	18
2.2.2 Gewebeaufarbeitung	19
2.2.3 Immunhistochemie.....	19
2.2.4 Auswertung.....	21
2.3. Statistik.....	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Makroskopische Befunde	22
3.1.1 makroskopisches Erscheinungsbild des Magens bei M2R-Gendefizienz ...	22
3.1.2 statistische Analyse auf Unterschiede der Magen- und Körpergewichte	23
3.2 Immunhistochemische Befunde	30
3.2.1 Ösophagus	30
3.2.2 Fundus gastricus	37
3.2.3 Pylorus.....	43
3.2.4-3.2.6 Duodenum, Jejunum, Ileum	48
3.2.4 Duodenum	49

3.2.5 Jejunum	52
3.2.6 Ileum.....	57
3.2.7 Caecum	63
3.2.8 Colon descendens	68
4. Diskussion.....	74
4.1 Verteilung und Bedeutung des M2R in der Tunica muscularis	75
4.2 Verteilung und Bedeutung des M2R in der Tela submucosa.....	77
4.3 Verteilung und Bedeutung des M2R in der Tunica mucosa	78
4.3.1 Lamina muscularis mucosae.....	78
4.3.2 Lamina propria mucosae	80
4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Verteilungsmuster in den einzelnen Organabschnitten	82
4.5 Magenvergrößerung bei M2R-Gendefizienz	83
5. Zusammenfassung	86
6. Summary	87
7. Literatur	88
Abbildungsverzeichnis.....	101
Danksagung	104
Publikationen.....	105
Erklärung zur Dissertation.	106

1. Einleitung

1.1 Histologischer Aufbau des Verdauungstraktes

Dem Wandaufbau des Verdauungstraktes liegt ein einheitlicher Aufbau zugrunde. Je nach vorrangiger Funktion wie Transport, Sekretion oder Resorption bestehen lokale Unterschiede in den einzelnen Abschnitten. Charakteristisch sind, in der Schichtenfolge von innen nach außen aufgelistet, die Tunica mucosa, die Tela submucosa, die Tunica muscularis und die Tunica adventitia bzw. Tunica serosa. Die Tunica mucosa weist die größten regionalen Unterschiede auf. Sie besteht aus drei Anteilen. Innen liegt die Lamina epithelialis mucosae, welche als Barriere dient, zusätzlich regional aber spezifische Aufgaben besitzt und deren Epithelauskleidung sich aus diesem Grund den einzelnen Organabschnitten angepasst hat. Daran schließt sich die Lamina propria mucosae an, welche hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe besteht. Darin kommen zahlreiche freie Zellen, wie z.B. Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen vor. Ferner verlaufen dort die terminalen Verzweigungen der Blut- und Lymphkapillaren. Daran schließt sich eine aus glatten Muskelzellen bestehende Lamina muscularis mucosae an. Sie vermittelt der Tunica mucosa eine lokalisierte Eigenbeweglichkeit und ist in ihrem Ausbildungsgrad von Abschnitt zu Abschnitt des Magen-Darm-Kanals unterschiedlich ausgeprägt. An die Tunica mucosa mit ihren Unterabteilungen schließt sich die Tela submucosa an. Sie besteht aus lockerem kollagenem Bindegewebe. In ihr verlaufen die größeren Blut- und Lymphgefäße. Sie dient als Verschiebeschicht für die Schleimhaut. Außerdem liegt ein Nervenplexus in ihr, der Plexus submucosus oder auch Meissner-Plexus. Er bildet zusammen mit dem Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) das enterische Nervensystem, welches die Motilität der Muskulatur sowie die Sekretion der in der Mukosa gelegenen Drüsen des Gastrointestinaltraktes steuert. Das enterische Nervensystem besteht in seiner Gesamtheit aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Neuronenarten (motorisch, sensorisch, Interneurone), welche ebenfalls durch verschiedene Neurotransmitter aktiviert oder inhibiert werden können (Costa et al. 1996, Timmermanns et al. 1997, Qu et al. 2008). Zusätzlich dienen noch interstitielle Zellen von Cajal (ICC) als Schrittmacher und Vermittler zwischen dem enterischen Nervensystem und der Muskulatur (Takayama et al. 2002, Sanders und Ward 2006, Olsson und Holgren 2011). Die ICC sind durch gap junctions miteinander verbunden und bilden auf diese Weise ein koordiniertes Netzwerk. Auf der einen Seite liegen sie

direkt an den Varikositäten der intramuralen Neurone, auf der anderen Seite sind sie über gap junctions mit glatten Muskelzellen verbunden (Rumessen et al. 1982, Komuro 2006). Diese funktionale Einheit ermöglicht rhythmische Kontraktionen und Relaxationen. Die ICC können aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen Nervenplexus und ihrer Lage zwischen den Muskelzellen unterteilt werden: zum einem in die ICC des Plexus myentericus (ICC-MP), welche slow-waves Kontraktion generieren, des Weiteren in die ICC innerhalb der zirkulären Muskelschicht (ICC-CM) und der longitudinalen Muskelschicht (ICC-LM), häufig zusammengefasst als intramuskuläre ICC (ICC-IM). Außerdem existieren noch ICC innerhalb des tiefen muskulären Plexus (deep muscular plexus ICC-DMP), der zwischen der inneren und äußeren Ringmuskelschicht liegt. Zusätzlich kommen sie noch in der Submukosa (ICC-SM) und der Subserosa (ICC-SS) vor. Während sie im Darm eher einheitlich verteilt sind, bestehen im Magen regionale Unterschiede im Verteilungsmuster der ICC, wo insbesondere die ICC-CM und die ICC-LM deutlich ausgeprägt sind, während die ICC-MP geringer vorkommen (Komuro 2006).

Die Tunica muscularis besteht mit Ausnahme der oberen zwei Drittel des Ösophagus aus glatter Muskulatur, welche in 2 Schichten gegliedert ist, das Stratum circulare (innere Ringmuskelschicht) und das Stratum longitudinale (äußere Längsmuskelschicht). Sie dient der Durchmischung der Nahrung und der Weiterbeförderung des Darminhaltes. Zwischen diesen beiden Schichten liegt in einer Bindegewebszone, der o.g. Plexus myentericus, welcher die Tunica muscularis innerviert. Ein Großteil der Abschnitte des Verdauungstraktes ist zur Bauchfellhöhle hin durch ein zur Tunica serosa zugehöriges einschichtiges Plattenepithel (Mesothel) bedeckt, das wiederum auf einer dünnen Bindegewebschicht, der Lamina propria serosae, liegt. An extraperitoneal (Ösophagus und Rektum) und retroperitoneal gelegenen (Duodenum, Teile des Kolon) Abschnitten wird die Serosa durch eine aus lockerem Bindegewebe bestehende Tunica adventitia ersetzt.

1.1.1 Ösophagus

Die Speiseröhre, der Ösophagus, ist ein beim Menschen ca. 25 cm langer Muskelschlauch und dient der Nahrungsbeförderung vom Pharynx in den Magen. Er lässt sich in drei wesentliche Abschnitte unterteilen: einen kurzen Halsteil, den Pars cervicalis, einen Brustteil, Pars thoracalis, welcher auch der längste Abschnitt ist, und dem Bauchteil, Pars abdominalis. Er ist grundsätzlich nach dem Bauplan des Verdauungstraktes aufgebaut. Die Lamina epithelialis mucosae besteht aus einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel. Darunter schließt sich eine dünnsschichtige Lamina muscularis mucosae an (Berdanier 2004). Die Tunica muscularis besteht aus einer äußeren Längs- und einer inneren Ringschicht, welche in der Adventitia beginnen und das Lumen schlingenartig umgreifen (Kaufmann et al. 1968). Sie besteht bei der Maus nur aus quergestreifter Muskulatur, während beim Menschen nur im oralen Abschnitt Skelettmuskulatur vorkommt und im Verlauf nach aboral durch glatte Muskulatur ersetzt wird (Green et al. 1966, Kaufmann et al. 1968). Die Blutversorgung erfolgt über ein adventitielles Arteriennetz, welches über ausgedehnte Anastomosen parallel zu den auf- und absteigenden Muskelbündeln zieht (Günther und Lierse 1968).

1.1.2 Magen

Der Magen des Menschen wird prinzipiell in vier Abschnitte unterteilt, den Mageneingang (Pars cardiaca), den Magenfundus (Fundus gastricus), den Magenkörper (Corpus gastricum) und den Magenausgang (Pars pylorica). Bei der Maus wird der Magen in 2 Regionen unterteilt. Zum einen in einen drüsenlosen, kutanen Vormagen sowie in einen Drüsenmagen, der in eine kleine Cardia-, eine große Fundus- und eine Pylorusregion unterteilt werden kann (Green et al. 1966, Treuting et al. 2012). Der Magen dient als Zwischenspeicher für die aufgenommene Nahrung, aber der Nahrungsbrei (Chymus) wird dort auch mechanisch und chemisch aufbereitet und partiell verdaut. Aufgrund dieser funktionalen Unterschiede existieren zwischen den einzelnen Magenabschnitten Besonderheiten im Wandaufbau. Während das Oberflächenepithel beim Menschen in allen Magenregionen einheitlich einschichtig hochprismatisch aufgebaut ist, besteht es bei der Maus im Vormagen aus einem mehrschichtigen Plattenepithel und wechselt ab einer erhabenen Begrenzungslinie, welche aus verdickter Lamina propria des Vormagens besteht, in den Drüsenmagen.

Dort enthalten die apikal gelegenen Zellhälften Schleimgranula, welche die Schleimhaut vor Andauung durch den Magensaft schützt. Die in der Lamina propria muscosae gelegenen Magendrüsen sind in den einzelnen Abschnitten unterschiedlich aufgebaut. Beim Menschen sind die Kardiadrüsen (*Glandulae cardiacae*), die Hauptdrüsen im Fundus und Corpus ventriculi (*Glandulae gastricae propriae*) und die Pylorusdrüsen (*Glandulae pyloricae*) zu unterscheiden. Die Kardiadrüsen liegen am Mageneingang im Übergang zum Ösophagus und sind muköse Drüsen, welche für eine Schleimbarriere zwischen dem sauren Magenmilieu und dem Ösophagus sorgen. Die Drüsen im Corpus und Fundus ventriculi sind wenig verzweigte tubulöse Drüsen, die bis zur Lamina muscularis mucosae reichen. In der Wand der Drüsenschläuche kommen unterschiedliche Zelltypen vor, welche in charakteristischer Weise auf die verschiedenen Drüsenabschnitten verteilt sind. Im Isthmus liegen die Nebenzellen, welche Muzin produzieren, im Halsteil (Cervix) die für die Salzsäureproduktion benötigten Belegzellen und im Hauptteil (Pars principalis) neben den o.g. Belegzellen viele Hauptzellen, welche Pepsinogene und eine Magenlipase synthetisieren und sezernieren. Die *Glandulae pyloricae* sind wiederum stärker verzweigt und reichen tiefer in die Lamina propria hinein. Sie unterscheiden sich histologisch und funktionell nicht wesentlich von den Kardiadrüsen. Die Magendrüsen beginnen bei der Maus erst im Fundus und bestehen dort ebenfalls hauptsächlich aus Haupt-, Neben- und Belegzellen. Den Abschluss der Magenschleimhaut bildet eine gut ausgeprägte Lamina muscularis mucosae. Daran schließt sich eine gefäßreiche Tela submucosa an. Die Tunica muscularis ist im Magen aufgrund seiner Funktion zur Vermischung des Chymus mit Enzymen und Säuren sowie des Weitertransportes in den Dünndarm besonders deutlich ausgeprägt. Zusätzlich zu den Strata circulare und longitudinale existiert im Magen eine weitere, schräg verlaufende Muskelschicht, die *Fibrae obliquae*. Diese liegt als dünne Muskelschicht zwischen der Tela submucosa und dem Stratum circulare, welches am prominentesten ausgeprägt ist (Treuting et al. 2012).

1.1.3 Dünndarm

Nachdem der Chymus den Pylorus passiert hat, erreicht er den Dünndarm, welcher sich in drei Abschnitte gliedert: Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm). Die Oberfläche der Schleimhaut wird durch Falten, Zotten und Mikrovilli stark vergrößert und durch Ringfalten (*Plicae circulares*, Kerckring-Falten) aufgeworfen. An ihrer Bildung sind die Mukosa und die Submukosa beteiligt, die Tunica muscularis jedoch nicht. Die Ringfalten sind im Duodenum am höchsten und

flachen dann nach aboral deutlich ab. Die Zotten (Villi intestinales) sind blatt- bis fingerförmige Erhebungen der Mukosa, zwischen deren Basen zahlreiche Krypten (Glandulae intestinales, Lieberkühn-Krypten) münden. Die Krypten reichen bis zur Lamina muscularis mucosae und sind Ort der Zellerneuerung. Die Villi intestinales sind von einem hochprismatischen Epithel überzogen. Die Hauptaufgabe des Epithels ist die Resorption. Als Gerüst für das Zottenstroma dient ein engmaschiges Gefäßsystem. Dieses reicht direkt bis unter das Epithel (Abbas et al. 1989). Die Endothelzellen direkt unterhalb des Epithels bestehen aus einer dünnen und einer dicken Region. Der dünne Teil liegt zum Epithel hin und ist fenestriert, während der dickere Anteil den Nucleus beinhaltet und zentral im Villus liegt. Das Kapillarnetz dient dem Abtransport von durch das Epithel resorbierten Molekülen. Es gelangt über eine zentral gelegene Venole in einem mukösen und submukösen Venenplexus. Ebenfalls zentral im Villus liegt ein Lymphgefäß, über welches aus dem Interstitium gesammelte Lymphe über submuköse Lymphbahnen abfließt. Parallel zur Längsachse der Zotten verlaufen glatte Muskelzellen, welche von der Lamina muscularis mucosae bis zur Zottenspitze ziehen. Diese Muskelzellen können während der Resorption rhythmische Kontraktionen ausführen. Durch diese „Pumpbewegungen“ wird einerseits der Blut- und Lymphabfluss gefördert, andererseits kommt das Zottenepithel mit neuem, resorptionsfähigem Material in Berührung. Das Dünndarmepithel ist ein einschichtiges hochprismatisches Epithel und besteht zu einem Grossteil aus Enterozyten. Der luminale Zellanteil wird durch Mikrovilli vergrößert. Zwischen den Enterozyten liegen schleimbildende Drüsenzellen, die Becherzellen. Diese produzieren als Gleitfilm für den Chymus Muzine. Die Anzahl der Becherzellen nimmt vom Duodenum in Richtung Ileum kontinuierlich zu.

Das Duodenum unterscheidet sich durch das Vorkommen von Brunner Drüsen (Glandulae submucosae) von den anderen Dünndarmabschnitten.

1.1.4 Dickdarm

Die Hauptfunktion des Dickdarmes ist die Resorption von Wasser und Elektrolyten und damit die Eindickung des Darminhaltes. Gleichzeitig erfolgt die Sekretion von Schleim (Muzine). Er gliedert sich in Caecum (Blinddarm), Colon (Grimmdarm), Rectum (Mastdarm) und Canalis analis (Analkanal). Der Schichtaufbau des Dünndarms setzt sich in modifizierter Form im Dickdarm fort. Die Schleimhautoberfläche ist relativ glatt. Es fehlen Plicae circulares und Zotten. Das Epithel ist einschichtig und hochprismatisch. Tiefe, eng stehende Krypten ziehen bis zur Tunica muscularis

mucosae. Diese enthalten hauptsächlich schleimbildende Becherzellen, resorbierende Enterozyten mit Mikrovillussaum so wie auch endokrine Zellen und sind Ort der Zellerneuerung. Die Lamina propria mucosae enthält Blut- und Lymphkapillaren sowie zahlreiche Zellen der Abwehr (Makrophagen, Eosinophile, Mastzellen). Die Lamina muscularis mucosae besteht aus mehreren Muskelzelllagen. In der Submukosa liegen reichlich Fettzellen sowie einige Lymphfollikel. Die Tunica muscularis besteht aus einer gut ausgeprägten Ringmuskelschicht. Die Längsmuskulatur ist auf Täten zusammengedrängt, dadurch kann eine longitudinale Verkürzung des Darmrohres erreicht werden. Je nach Peritonealverhältnissen ist er von einer Adventitia oder Serosa bedeckt (Drenckhahn 2008).

1.2 Das cholinerge System

1.2.1 Funktion des Acetylcholins im Verdauungstrakt

Acetylcholin ist ein wichtiger Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems. Über cholinerge Neurone beeinflusst es sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zielzellen über die jeweiligen Rezeptoren. Acetylcholin wird aus Cholin und Acetyl-CoA im Zytosol der Nervenendigungen gebildet. Anschließend wird es in Vesikeln gespeichert und bei Bedarf mittels Exozytose aus diesen in den synaptischen Spalt entlassen, wo es zu einer Aktivierung des Rezeptors an der Zielzelle kommt. Diese Rezeptoren unterteilen sich in zwei Hauptgruppen, nikotinische und muskarinische Rezeptoren. Sie wurden bereits 1914 von Sir Henry Dale nach den Stoffen, für welche sie eine hohe Affinität besitzen, benannt (Burgen 1995). Nikotinerge Rezeptoren werden durch Nikotin, dem Hauptalkaloid der Tabakpflanze (*Nicotinia tabacum*) aktiviert und durch Curare gehemmt, während die muskarinergen Rezeptoren (MR) selektiv durch Muskarin, dem Alkaloid des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria* var. *muscaria*) aktiviert und durch Atropin geblockt werden. Diese beiden Hauptgruppen lassen sich in viele weitere Untergruppen aufteilen, kommen prä- und postsynaptisch vor und werden im zentralen sowie im peripheren Nervensystem exprimiert. Die MR vermitteln ihre Zellantwort mittels eines second messenger und intrazellulären Signalkaskaden (Caulfield und Birdsall 1998). Durch die unterschiedlichen Signalkaskaden der einzelnen MR und ihrer unterschiedlichen morphologischen Verteilung kommt es zu einer Vielzahl von Zellantworten. Im Gastrointestinaltrakt werden über die MR insbesondere die Kontraktion der glatten Muskulatur und die Drüsensekretion reguliert (Caulfield 1993, Eglen et al. 1996 und

2001, Ehlert 2003, Tobin et al. 2009). Auch wurde bereits gezeigt, dass der Ionentransport im Ileum und Colon der Ratte durch die Aktivierung von MR an der Zellmembran von Enterozyten gesteigert werden kann (Rimele und Gaginella 1982). Gleiches gilt für die Permeabilität von Makromolekülen im Jejunum der Maus, welche ebenfalls dem Einfluss von Acetylcholin unterliegt (Cameron and Perdue 2007). Während lange Zeit der Fokus auf der Rolle des Acetylcholins als Neurotransmitter beruhte, wird zunehmend klarer, dass Acetylcholin ubiquitär vorkommt und auch in vielen nicht-neuronal beeinflussten physiologischen Abläufen eine wichtige Rolle spielt (Wessler et al. 1998 und 2003). Beide Rezeptorgruppen wurden in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen, also in Zellen, welche unabhängig von Neuronen sind und in denen das Acetylcholin als auto- oder parakriner Botenstoff wirkt (Wessler et al. 1998 und 2003, Eglen 2006). So wurde die Cholinacetyltransferase als essenzielles Enzym der Acetylcholinsynthese in verschiedenen nicht-neuronalen Zelltypen nachgewiesen. Als Beweis für die Befähigung zur Acetylcholinsynthese wird auch der Nachweis der Expression des cholinergen Genlocus herangezogen (Eiden 1998). Erste Untersuchungen diesbezüglich wurden 1966 von Morris für die humane Placenta beschrieben (Morris 1966). Seitdem ist Acetylcholin in einer Mehrzahl von verschiedenen nicht-neuronalen Geweben beschrieben worden, wie z.B. im Endothel der Pulmonalarterie (Haberberger et al. 2000), im Rattenhoden (Schirmer et al. 2011) und in humaner Haut (Kurzen und Schallreuter 2004). Die genaue Speicherung des Acetylcholins in diesen Zellen und der Freisetzungsmechanismus sind bislang noch unbekannt (Klapproth et al. 1997, Wessler et al. 2003). Bereits 1984 konnte Furchgott zeigen, dass durch Acetylcholin aktivierte muskarinische Rezeptoren auf Endothelzellen mittels eines endothelium-derived relaxing factor (EDRF) eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermitteln (Furchgott 1984). Darauf folgten verschiedene Untersuchungen, die den Mechanismus der durch Endothelzellen vermittelten Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur erforschten bzw. diskutierten (Peach et al. 1985). Für die glatte Gefäßmuskulatur der Aorta der Maus konnte z.B. eine Stickstoffoxid-induzierte Vasodilatation gezeigt werden, welche insbesondere der MR-Subtyp M3 steuert (Khurana et al. 2004).

Im Oberflächenepithel des Dün- und Dickdarmes konnte ebenfalls nicht-neurales Acetylcholin nachgewiesen werden (Wessler et al. 1998, Klapproth et al. 1997). Insbesondere werden dem M1R und dem M3R eine Bedeutung bei der Sekretion und Resorption zugesprochen (Hirota und McKay 2006, Haberberger et al. 2006). Allerdings besteht ebenfalls eine Beeinflussung der epithelialen Chlorid-Ionen Sekretion durch die in der Mukosa gelegenen cholinergen Neurone (Cooke 1984). Aufgrund der Vielzahl von verschiedenen Neuronen und Neurotransmitter im

Gastrointestinaltrakt und deren Interaktion ist eine genaue Differenzierung der Funktion der verschiedenen zellulären Quellen des Acetylcholins im Ionentransport erschwert (McConalogue und Furness 1994).

1.3 Muskarinische Rezeptoren

1.3.1 Einteilung und Aufbau von muskarinischen Rezeptoren

Acetylcholin bindet in der Körperperipherie an Rezeptoren und vermittelt auf diese Weise seine Wirkung auf die Effektorzelle. Wie bereits beschrieben existieren zwei unterschiedliche Rezeptorklassen, die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren und die muskarinischen. Erste wissenschaftliche Untersuchungen sowie die Isolierung der einzelnen Substanzen begannen bereits im neunzehnten Jahrhundert (Burgin 1995). Eine weitere Klassifizierung der Rezeptoren erfolgte durch die Erforschung von weiteren selektiven Agonisten und Antagonisten. 1951 zeigten Riker und Wescoe für Gallamin eine kardioselektive antagonistische Wirkung am MR (Hulme et al. 1990, Caulfield und Birdsall 1998). Durch die Entdeckung weiterer Antagonisten konnte im Verlauf eine weitere Unterteilung in einzelne Subtypen und deren physiologische Rollen vorgenommen werden. Diese binden mit einer unterschiedlichen Affinität an den einzelnen MR (Caulfield und Birdsall 1998, Eglen et al., 1996 und 1999). Eine Schlüsselrolle nimmt dabei das Pirenzepin ein, das eine sehr hohe antagonistische Affinität zu den MR im Gehirn und im Magen hat, während es eine deutlich niedrigere Affinität zu den kardialen MR besitzt (Hosey 1992). Durch die Erforschung der genetischen Struktur der MR konnten durch molekularbiologische Methoden weitere Rezeptorsubtypen differenziert werden, so dass bis zum heutigen Tag die Existenz von fünf unterschiedlichen muskarinischen Rezeptoren (M1R-M5R) nachgewiesen werden konnte. Sie alle gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Caulfield 1993, Wess 1996) und besitzen eine gemeinsame Rezeptorstruktur. Es sind Glykoproteine, welche aus sieben Transmembrandomänen in α -Helixform bestehen und durch intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Ein aminoterminal Ende (N-Terminus) liegt extrazellulär, zytosolisch endet der Peptidstrang mit einem carboxyterminalen Ende (C-Terminus). Zwischen der zweiten und der dritten extrazellulären Schleife liegen zwei über eine Disulfidbrücke verbundene Cysteinreste, die einerseits die Tertiärstruktur des Rezeptors stabilisieren und andererseits auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der aktiven

Rezeptorkonformation spielen (Hulme et al. 1990, Strader et al. 1994, Caulfield und Birdsall 1998). Die G-Proteine sind Heterotrimere und bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Es existieren verschiedene G-Proteine, die sich in den jeweiligen Untereinheiten unterscheiden und dadurch verschiedene Enzyme oder Ionenkanäle stimulieren oder inhibieren (Strader et al. 1994). Die α -Untereinheit ist hauptverantwortlich für die physiologische Funktion des G-Proteins. In Bezug auf die MR können die G-Proteine aufgrund der unterschiedlichen α -Untereinheit in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Zum einen in die Gruppe der G_i -Proteine, welche die membranständige Adenylatzyklase und dadurch ebenfalls die Bildung des second messengers zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) hemmen und so weitere Stoffwechselwege beeinflussen. Zum anderen in die der G_q -Proteine. Diese aktivieren die Phospholipase C und führen anschließend über die second messenger Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) zu einer Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels bzw. einer Aktivierung der Proteinkinase C. Dies leitet letztendlich eine Aktivierung verschiedener Enzyme ein und bewirkt so eine Zellantwort. Die MR-Subtypen M2R und M4R gehören der ersten Gruppe an, während die Subtypen M1R, M3R und M5R der zweiten Gruppen zuzuordnen sind. Nach Stimulation des MR an der Zelloberfläche mit einem exogenen Liganden beginnt eine Signaltransduktionskaskade. Es kommt zu einer Konformationsänderung und zur Freilegung der G-Protein Bindungsstelle. Der Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) führt zu einer Dissoziation der α -Untereinheit vom Rest des G-Proteins. Diese kann nun zu zell- oder membranständigen Proteinen diffundieren und deren Signalübertragungskaskade (s.o.) aktivieren oder inhibieren.

1.3.2 Vorkommen und Wirkung der muskarinischen Rezeptoren im Verdauungstrakt

MR werden von Zellen im gesamten Körper exprimiert. Bereits in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte eine Forschungsgruppe (Barlow et al. 1972 und 1976) pharmakologische Unterschiede zwischen MR in verschiedensten Geweben wie dem Herzvorhof, dem Ileum, der Bronchialmuskulatur und der Iris nachweisen (Ehlert et al. 1997, Caulfield und Birdsall 1998). Aufgrund der großen Anzahl von MR an der Zelloberfläche von glatter Muskulatur und deren relativ leichter Gewebegewinnung wurde insbesondere der Verdauungstrakt (Magen, Dünndarm, Dickdarm) an verschiedenen Tiermodellen untersucht. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Rolle des MR in der Muskelkontraktion gelegt (Eglen et al. 1996). Mittlerweile existieren eine Vielzahl von Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen und Geweben. Aufgrund

der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden wie Ligandenbindungsstudien, immunhistochemischen Untersuchungen, elektrophysiologischen Tests oder autoradiographischen Verfahren, sowie dem Fehlen von hoch selektiven Agonisten und Antagonisten und lange Zeit auch von spezifischen Antikörpern (Pradidarcheep et al. 2008 und 2009, Jositsch et al. 2009) für die einzelnen MR und der Tatsache, dass Zellen mehrere Subtypen des MR exprimieren, fallen die Ergebnisse teilweise unterschiedlich aus (Hulme et al. 1990, Caulfield und Birdsall 1998, Wess 2004). Wir untersuchten in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie einzelne Abschnitte des Verdauungstraktes von C57/B6Ntac Mäusen. Da auch die Spezifität von Antikörpern gegen den MR sehr unterschiedlich ist (Pradidarcheep et al. 2008 und 2009, Jositsch et al. 2009), verwendeten wir zur Kontrolle eine MR knockout Maus (MR KO-Maus), die durch das Ausschalten von den jeweiligen kodierenden Genabschnitten für den M2R und M3R gendefizient ist. Diese MR KO-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen Unterschiede in Bezug auf die Lebensdauer oder die Fertilität (Gomez et al. 1999, Matsui et al. 2002). Auch bei der der Präparation der Tiere und der anschließenden histologischen Untersuchung einzelner Organe wie Herz, Lunge und Milz wurden bisher keine wesentlichen Unterschiede beschrieben (Matsui et al. 2002). Jedoch wurden Unterschiede in der Gehirnfunktion wie Erinnerungs- und Lernvermögen gemessen (Seeger et al. 2004). Durch das Fehlen eines MR-Subtypen kommt es nicht zu einer veränderten Expression der übrigen vier MR (Gomez et al. 1999). Verschiedene immunhistochemische Untersuchungen für den Gastrointestinaltrakt konnten die MR auf glatter Muskulatur, auf Ganglien des Plexus myentericus und Plexus submucosus, auf Epithelzellen und an Blutgefäßen nachweisen (Badaut et al. 1997, Iino und Nojyo 2006, Takeuchi et al. 2005 und 2006, Harrington et al. 2008 und 2010).

Der M1R ist mit einem Anteil von ca. 40-50% der häufigste MR in verschiedenen Gehirnregionen (z.B. Cortex, Hippocampus, Thalamus, Cerebellum) (Levey 1993, Bymaster et al. 2003). M1R KO-Mäuse zeigen eine erhöhte lokomotorische Aktivität, aber keine kognitiven Unterschiede im Lernen und Erinnerungsvermögen (Miyakawa et al. 2001, Wess et al. 2003). Außerdem ist er in größerer Anzahl in den Speicheldrüsen (Levey 1993) und im Ganglion cervicale superius (Caulfield und Birdsall 1998) vorhanden. Im Colon des Menschen wurde der M1R auf Nervenzellen des Plexus myentericus und des Plexus submucosus entdeckt (Harrington et al. 2010). Im Colon der Maus wurde die mRNA des M1R im Epithel der Krypten nachgewiesen, wo er Einfluss auf den Ionentransport hat (Haberberger et al. 2006). Von allen muskarinischen Rezeptorsubtypen ist seine numerische Anzahl am geringsten, er kommt hauptsächlich im Gehirn vor.

Von den fünf bekannten MR werden insbesondere der M2R und der M3R im Verdauungstrakt exprimiert (Eglen et al. 1996, Ehlert et al. 1997). Sie sind hauptverantwortlich für die durch Acetylcholin induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur des Verdauungstraktes und kommen sowohl im Stratum circulare als auch im Stratum longitudinale vor (Dörje et al. 1991, Takeuchi et al. 2005, Iino und Nojyo 2006, Harrington et al. 2008 und 2010). Dabei wirken sie additiv (Ehlert 2003, Braverman et al. 2008). Während der M3R über seine second messenger IP3 und DAG eine direkte Muskelkontraktion bewirkt, bewirkt eine Aktivierung des M2R eine Hemmung der cAMP Synthese und dadurch eine indirekte Kontraktion durch Inhibierung einer Relaxation (Uchiyama und Chess-Williams 2004, Kitazawa et al. 2007).

Der M3R ist der entscheidende Rezeptor für die Muskelkontraktion, während der M2R redundant ist oder als back-up System fungiert, falls es zu einer Störung in der Signalkaskade des M3R-Systems kommt (Braverman et al. 2008). Außerdem wird ihm eine regulierende Eigenschaft bei der Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt zugewiesen. So scheint der M2R die Initialisierung und die Terminierung der Acetylcholinfreisetzung zu beeinflussen (Slutsky et al. 2002). Im Ileum der Maus zeigte sich auch eine Markierung für den M2R auf cholinergen Neuronen im Plexus myentericus (Takeuchi et al. 2005). Im Dünndarm und Colon des Meerschweinchens zeigten außerdem ICC eine Markierung mit M2R-Antikörper (Iino und Nojyo 2006, Harrington et al. 2008). Der M3R hat außerdem eine wichtige Funktion bei der Speichelsekretion, bei der Muskelkontraktion in der Blase, der Trachea, des Verdauungstraktes sowie der Pupille (Levey 1993, Caulfield und Birdsall 1998, Matsui et al. 2000, Bymaster et al. 2003, Stengel et al. 2002). Während er in der Blasenmuskulatur hauptverantwortlich für die Vermittlung der Muskelkontraktion ist, beträgt sein Anteil an der Carbachol-induzierten maximalen Kontraktion im Magenfundus ca. 50-60% (Stengel et al. 2002). Die Kontraktilität des Musculus detrusor vesicae in KO-Tieren ist auf ca. 5% von der des Wildtypes reduziert (Matsui et al. 2004). Über die Veränderung der Speichelsekretion in diesen Tieren wird kontrovers diskutiert. Während Matsui 2004 eine deutliche Reduktion gemessen hat, konnte Wess (2003) keinen Unterschied feststellen (Matsui et al. 2004, Wess et al. 2003). Diese Beobachtungen lassen sich, wie bereits oben beschrieben, mit dem multiplen Vorkommen der verschiedenen muskarinischen Rezeptoren in den jeweiligen Organen und den damit verbundenen Kompensationsmechanismen erklären. Beide Arbeitsgruppen konnten einen deutlichen Gewichtsunterschied zwischen den KO- und den Wildtyp-Mäusen messen. M3R KO-Mäuse haben ein um ca. 25% geringeres Körpergewicht. Dies ist durch eine geringere Nahrungsaufnahme bedingt, welche

Wess auf eine verminderte Produktion des appetitstimulierenden Hormons Melanin concentrating hormone (MCH) zurückführt, während Matsui auf eine deutlich reduzierte Speichelsekretion schließt. Eine Änderung in der Entleerungsrate des Magens zwischen den KO- und den Wildtypmäusen konnte nicht festgestellt werden (Kitazawa et al. 2007).

Der M4R hat im Gehirn ein ähnliches Verteilungsmuster wie der M1R. Die größte Anzahl liegt im Striatum (29%), während sein Anteil im Thalamus, Hippocampus und Cortex ca. 15% aller MR beträgt (Levey 1993). In peripheren Organen ist er vermehrt in der Lunge, den Speicheldrüsen und der Muskulatur des Ileums nachgewiesen worden (Bymaster et al. 2003, Dörje et al. 1991). Im Gegensatz zur Gallenblase (Oktay et al. 1998) hat der M4R im Magenfundus, der Blase oder der Trachea keinen Einfluss auf die Kontraktilität (Stengel et al. 2000). Immunhistochemisch konnte er bereits im Plexus myentericus des Ileums der Maus nachgewiesen werden. Auf glatten Muskelzellen wurde er nicht gefunden (Takeuchi et al. 2005).

Das Expressionslevel des M5R ist im Gegensatz zu den übrigen MR deutlich geringer. Zusätzlich fehlten direkte Nachweismethoden. Daher waren sein Vorkommen und seine physiologische Wirkung lange Zeit ungeklärt (Matsui et al. 2004). Studien an MR KO-Tieren konnten bisher seine Bedeutung in der Regulierung der Gehirndurchblutung sowie über dopaminerge Neurone im Striatum einen Einfluss auf Morphinwirkung bzw. Drogeneinfluss nachweisen (Elhousseiny et al. 2000, Basile et al. 2002).

1.4 Fragestellung

Muskarinische Rezeptoren sind wichtige Regulatoren bei vielen Funktionen des zentralen und peripheren Nervensystems, da an ihnen das Acetylcholin, ein wichtiger Neurotransmitter, bindet. Erste Hinweise auf die Existenz von MR gibt es seit 1951 durch Riker und Wescoe (Caulfield und Birdsall 1998). Bis heute wurden 5 Rezeptorsubtypen, M1R-M5R, identifiziert (Caulfield 1993). Aufgrund des ähnlichen Aufbaus, des mehrfachen Vorkommens zweier Rezeptorsubtypen und der Tatsache, dass diese in den verschiedensten Geweben exprimiert werden, sind sowohl immunhistochemische als auch physiologische Untersuchungen zur Funktion der einzelnen Rezeptoren erschwert.

Durch molekulargenetische Techniken konnten Mausstämme generiert werden, welche für jeweils einen der fünf Rezeptortypen defizient sind. Im Zuge dessen konnten verschiedene physiologische Funktionen der einzelnen Rezeptoren in der Signalübertragung des Acetylcholins entschlüsselt werden.

Von der genauen Erforschung der einzelnen muskarinischen Rezeptoren erhofft man sich Fortschritte bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten, wie z.B. dem Morbus Alzheimer, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, der überaktiven Harnblase oder dem Reizdarmsyndrom. Ein Artikel im deutschen Ärzteblatt 2012 über die Forschungsansätze in der Alzheimer-Forschung verdeutlicht, wie aktuell diese Forschungsthemen sind (Grübler 2012).

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass insbesondere der M2R und zu einem kleineren Anteil auch der M3R die am meisten exprimierten Rezeptoren in den Muskelschichten des Verdauungstraktes sind (Levey 1993, Ehlert et al. 1997). Seitdem wurden einzelne Abschnitte bzw. Organe an verschiedenen Tiermodellen (Ratte, Kaninchen, Meerschwein, Maus) insbesondere unter funktionellen Aspekten untersucht. Eine vollständige Identifizierung des Verteilungsmusters im Gastrointestinaltrakt fehlt aber bisher.

Ziel dieser Arbeit ist es, die muskarinischen M2-Rezeptoren im Verdauungstrakt der Maus vom Ösophagus bis zum Colon descendens zu lokalisieren und die zelluläre Verteilung in den einzelnen Organabschnitten zu erfassen. Hierzu wurde die etablierte Methode der Immunhistochemie angewandt. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den M2R verwendet, welcher sich bei der Austestung im Vergleich von M2R-gendefizienten Mäusen mit den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen als spezifisch erwies (Jositsch et al. 2009). Darüber hinaus wurden die Magengewichte im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht zwischen gendefizienten und Wildtyp-Mäusen registriert und statistisch ausgewertet, um organomorphologische Veränderungen zu erfassen.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die histologische Verteilung ergeben sich weitere Hinweise auf die biologischen Funktionen des M2R und daraus folgend auch auf therapeutische Aspekte der Erkrankungen des Verdauungstraktes.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Immunhistochemie wurden C57/B6Ntac Mäuse (Charles River Laboratories Sulzfeld, D) beiderlei Geschlechts im Alter von 10 Wochen mit einem Körpergewicht von 20,2 g – 23,1 g sowie eine für die muskarinischen Rezeptoren M2R und M3R gendefiziente Maus im Alter von 17 Wochen mit einem Gewicht von 22,3 g verwendet. Für die statistische Auswertung wurden zusätzlich M2R-gendefiziente Mäuse mit dem korrespondierenden Wildtyp verwendet. Die Mäuse stammten aus dem Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Giessen und wurden spezifiziert pathogenfrei gehalten.

2.1.2 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 spezifiziert.

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
M2 muskarinischer Acetylcholinrezeptor	Ratte, monoklonal, Klon M2-2-B3	1:400	Chemicon International Temecula, USA
CD31 (PECAM-1)	Ratte, monoklonal, Klon MEC 13.3, biotiniliert	1:500	BD Biosciences San Jose, USA
Smooth Muscle Actin	Maus, monoklonal Klon 1A4, FITC-konjugiert	1:800	Sigma-Aldrich St. Louis, USA

Tabelle 1: Primärantikörper zur immunhistochemischen Darstellung von muskarinischen Rezeptoren des Typs M2R, Endothelzellen und glatten Muskelzellen

2.1.3 Sekundärreagenzien

In Tabelle 2 sind die genutzten Sekundärantikörper aufgelistet.

Reagenz	Konjugat	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle
Anti-Ratten-IgG	Indocarbocyanin (Cy3)	Esel, polyklonal	1:1000	Dianova Hamburg, D
Streptavidin	Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)	Streptomyces avidinii	1:500	Sigma-Aldrich St. Louis, USA

Tabelle 2: Sekundärreagenzien

Der Primärantikörper Anti- α -Smooth Muscle Actin ist mit FITC konjugiert, so dass hier die Inkubation mit einem Sekundärantikörper entfiel.

2.1.4 Chemikalien

Substanz	Firma	Ort
Aceton	Merck KGaA	Darmstadt, D
Dinatriumhydrogen- phosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, D
Glycerol, wasserfrei	Merck KGaA	Darmstadt, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim, D
Natriumazid	Merck KGaA,	Darmstadt, D
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, D
Natriumhydrogen- carbonat	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumhydrogen- phosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, D
Pferdeserum	HyClone	Bonn, D
Rinderserum- albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, D
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, D

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

2.1.5 verwendete Lösungen

Stammlösung A (0,2 M) für Phosphatpuffer

31,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
in 1000 ml Aqua destillata.

Stammlösung B (0,2 M) für Phosphatpuffer

35,60 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
in 1000 ml Aqua destillata.

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)

Zu 22,40 g Natriumchlorid wurden 28,75 ml der Stammlösung A und
96,20 ml Stammlösung B gegeben, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Gemisch
auf 5 Liter mit Aqua destillata aufgefüllt.

PBS + NaCl (PBS mit doppeltem Salzgehalt)

Zu 44,8 g Natriumchlorid wurden 28,75 ml der Stammlösung A und
96,20 ml Stammlösung B gegeben, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Gemisch
auf 5 Liter mit Aqua destillata aufgefüllt.

PBS + NaCl + NaN_3 (Phosphatgepufferte Salzlösung plus Natriumchlorid plus Natriumazid 0,1%)

2,875 ml der Stammlösung A wurden mit 9,620 ml der Stammlösung B gemischt. Dazu
wurden 2,24 g Natriumchlorid sowie 0,5 g Natriumazid gegeben und auf 500ml mit
Aqua destillata aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C

Rattenserum

Kardial gewonnenes Vollblut wurde für 48 h im Kühlschrank bei $+4^\circ \text{C}$ gelagert. Durch
Zentrifugieren, Abpipetieren des Überstandes und die Wiederholung dieses Vorganges
wurde das Serum isoliert.

Das Rattenserum wurde mit PBS zu einer 5%igen Lösung verdünnt.

Blocklösung

Um die Zellmembran zu permeabilisieren und unspezifische Proteinbindungsstellen zu
sättigen erfolgte die Verwendung einer Blocklösung, bestehend aus

10% normales Pferdeserum

0,1% Rinderserumalbumin (BSA)

0,5% Tween 20 in PBS.

gepuffertes Glycerol

50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

mit 0,5 M Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3) auf pH-Wert 8,6 einstellen.

Einen Teil dieser Pufferlösung mit zwei Teilen Glycerol mischen.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebegewinnung

Zuerst wurde das Lebendgewicht mit einer Feinwaage auf das Zehntelgramm genau bestimmt. Anschließend wurden die Tiere durch Inhalation einer Überdosis Isofluran getötet und durch einen abdominalen Medianschnitt von der Regio cervicalis superior bis zur Regio pubica geöffnet. Daraufhin wurde den Tieren in folgender Reihenfolge 0,5–1 cm große Gewebeproben aus folgenden Organen entnommen:

1. Thorakaler Ösophagus
2. Magenfundus
3. Pylorus
4. Duodenum
5. Jejunum
6. Ileum
7. Caecum
8. Colon descendens

Bevor der Magen in einen Fundus- und einen Pylorusabschnitt aufgeteilt wurde, wurde er mit einer 5 ml fassenden Einwegspritze und unter Verwendung einer Knopfkanüle mit PBS gespült und sein Leergewicht bestimmt. Aus dem Gesamtkörpergewicht und dem Magengewicht wurde der Quotient gebildet. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben immer aus den gleichen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes entnommen wurden. Nachdem das Gewebe mit einem Wattestäbchen und einem kurzem Waschvorgang in PBS vom Darminhalt gereinigt war, wurde es in einer Cryomold (15 x 15 x 5 mm) (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) platziert, mit Tissue Tek bedeckt und eingefroren. Zu diesem Zweck wurde Isopentan mit Flüssigstickstoff

gekühlt und die Cryomold solange in die flüssige Phase des Isopentan gelegt, bis das mit Tissue Tek bedeckte Gewebe vollkommen eingefroren war. Danach wurde das Cryomold kurz in flüssigem Stickstoff weiter gefroren. Bis zur Verwendung wurden die Gewebeproben bei -80°C in einem Tiefkühlschrank gelagert.

2.2.2 Gewebeaufarbeitung

Die Proben wurden aus dem Cryomold entnommen, auf Filterpapier (\varnothing 32 mm, Schleicher&Schuell Micro Science GmbH, Dassel, D) mit Hilfe von Tissue Tek festgefroren und in einem Kryostaten CM 3000 (Fa. Leica, Bensheim, D) so eingespannt, dass Schnitte senkrecht zur Schleimhautoberfläche des Organs geführt wurden. Die Temperatur des Kryostaten sowie des Schneidemessers betrug -20°C . Es wurden 10 μm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden pro Objektträger in 2 Gruppen unterteilt, um eine Spezifitätskontrolle des Sekundärantikörpers zu ermöglichen. Die Schnitte wurden für 10 min mit Aceton bei -20°C fixiert und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Durch die jeweilige Umrandung der beiden Schnittgruppen mit einem Fettstift wurden die zu inkubierenden Flächen verringert und das spätere Verlaufen der Lösungen verhindert.

2.2.3 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden für eine Stunde mit einer Blocklösung versehen, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach Entfernung der Lösung wurde eine Schnittgruppe mit 100 μl des Primärantikörpers (siehe Tabelle 1) und zur Negativkontrolle die andere Gruppe mit PBS+NaCl benetzt und über Nacht in einer feuchten, luftdichten Kammer im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die Inkubation der Gewebe mit PBS und NaCl diente der Kontrolle des Sekundärsystems. Auf diese Weise kann die Spezifität des Sekundärantikörpers beurteilt werden. Die Spezifität des Primärantikörpers gegen den M2R wurde durch die Austestung am M2R/M3R KO-Tier nachgewiesen. Der Primärantikörper wurde am nächsten Morgen mittels einer Pumpe abgesaugt und die Objektträger für 2 x 10 min in einer mit PBS gefüllten Küvette gewaschen. Als Nächstes wurden die Schnitte für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) inkubiert und in einer feuchten Kammer dunkel gelagert. Um die Lokalisation der Antikörperbindung sichtbar zu machen, wurden

fluoreszierende Sekundärantikörper verwendet, die gegen die speziesabhängigen Immunglobulin-Antigene gerichtet sind. Danach wurde der Sekundärantikörper abgesaugt und die Schnitte erneut für 2 x 10 min mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran folgte eine Nachfixierung für 10 min in 4% Paraformaldehyd und abermaliges Waschen für 2 x 10 min in PBS. Daraufhin wurden die Schnitte mit 30 µl Carbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) benetzt und mit Deckgläsern versehen. Es wurden zwei verschiedene Doppelmarkierungen angefertigt. Zum einen wurde der M2R, welcher mittels Cy3-gekoppelter Anti-Ratten-IgG markiert wurde, zusammen mit glatten Muskelzellen, die durch einen FITC-konjugierten Anti- α -Smooth Muscle Actin angefärbt wurden, dargestellt. Zum anderen wurde der M2R zusammen mit Endothelzellen gekennzeichnet. Diese wurden durch den biotinierten Anti-CD31 (PECAM-1) detektiert und über eine Streptavidin-Brücke mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC nachgewiesen. Um diese Doppelmarkierung zu ermöglichen, war eine Änderung des Versuchsprotokolls nötig. Nach einer wie oben beschriebenen Immunhistochemie mit dem M2R- Primärantikörper und einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper wurden nach der Fixierung mit 4% Paraformaldehyd die Objektträger für 1 Stunde mit 100 µl 5%igem Rattenserum inkubiert, um alle Bindungsstellen des Sekundärantikörpers abzusättigen. Das Serum wurde nach 1 Stunde entfernt. Nach diesem Schritt folgte eine Inkubation über Nacht mit einem CD31 (PECAM-1) Antikörper bzw. PBS+NaCl zur Negativkontrolle in einer feuchten Kammer. Am darauf folgenden Tag wurden die Objektträger für 2 x 10 min mit PBS gewaschen und für 1 Stunde mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach abermaligem Absaugen und 2 x 10 min Waschen in PBS erfolgte eine Nachfixierung in 4% Paraformaldehyd für 10 min. Nach Wiederholung des Waschens in PBS für 2 x 10 min wurden die Objektträger mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt. Alle Objektträger wurden im Dunkeln bei +4° C aufbewahrt und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Negativkontrolle diente zur Überprüfung der Spezifität des Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 1 und 2). Pro Objektträger wurden 2 Schnitte auf diese Weise behandelt.

2.2.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging mot, Carl Zeiss AG, Göttingen, D) und an einem Confocal Laser Scanning Mikroskop (Leica SP2–AOBS, Bensheim D). Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Filter verwendet.

Fluorochrom	Anregungsfilter (nm)	Dichroischer Spiegel (nm)	Sperrfilter (nm)
Cy3	525-556	555	570-650
FITC	460-490	505	515-550

Tabelle 4: verwendete Fluorochrome und Fluoreszenzfilter für die Epifluoreszenzmikroskopie

Cy3 leuchtet orange, FITC grün. Markierte Bereiche wurden aufgesucht und anschließend mit Hilfe des Programms Axio Vision 3,0 (Carl Zeis Vision GmbH, Göttingen, D) fotografiert und auf einen Computer gespeichert. Bei der Beurteilung der Schnitte wurde auf Intaktheit und homogene Anfärbung des Gewebes geachtet.

2.3. Statistik

Für die statistische Auswertung des Magen-Lebendgewicht-Quotienten von M2R-KO und korrespondierenden Wildtyp-Mäusen wurde SSPS (Version 11.0, SSPS Inc. Headquarters Chicago, IL, USA) verwendet. Es erfolgten eine explorative Datenanalyse und Testung mit dem 2 seitigen t-Test für unabhängige Stichproben. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse in Form von Boxplots und Punktwolken dargestellt. Insgesamt wurden 57 Mäuse in die statistische Auswertung mit einbezogen, welche in einem ersten Schritt in eine Gruppe von M2R-KO Mäuse (n=29) und eine Gruppe von M2R-WT Mäuse (n=28) getrennt wurden. Unvollständig erhobene Daten, wie fehlendes Alter und Geschlecht, wurden hierbei nicht weiter berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Makroskopische Befunde

3.1.1 Makroskopisches Erscheinungsbild des Magens bei M2R-Gendefizienz

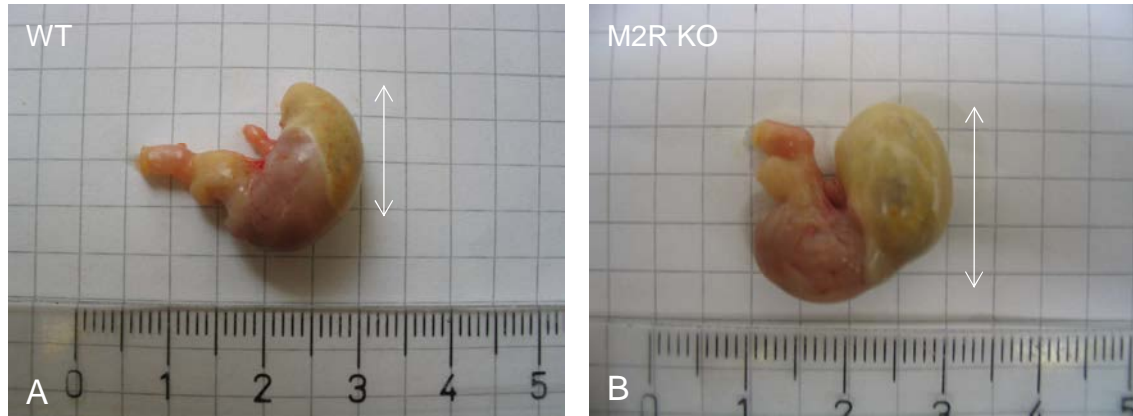


Abbildung 1: Vergleich der Mägen von M2R-KO- und WT-Mäusen

Die Photographien zeigen die jeweils frisch entnommenen, noch nicht vom Mageninhalt befreiten Mäusemägen (Abbildung 1) aus den verwendeten Wildtypen (WT, Bild A) und M2R Knockouttieren (M2R KO, Bild B). Während die Magengröße augenscheinlich nicht wesentlich verändert ist, so erscheint insbesondere der Vormagen (Pfeile) der KO-Maus deutlich aufgebläht.

3.1.2 Statistische Analyse auf Unterschiede der Magen- und Körpergewichte

Im ersten Schritt wurde die Gruppe der M2R KO-Mäuse (n=29) von der Gruppe der WT-Mäuse (n=28) getrennt. Dabei wurden drei Variablen bei der statistischen Untersuchung berücksichtigt: das Magengewicht, das Körpergewicht und der daraus errechnete Quotient (Magengewicht/Körpergewicht). Alle drei Variablen zeigten zwischen den beiden Mausstämmen einen signifikanten Unterschied bei durchgeführtem 2-seitigem t-Test, bei allen drei betrug $p \leq 0,001$.

Bei der separaten Betrachtung der Werte für das Körper- und Magengewicht (Abbildung 2 und 3) fallen Unterschiede auf. So liegt der Mittelwert des Körpergewichtes bei den M2R KO-Mäusen bei $30,10 \pm 4,26$ g (Standardabweichung, SD), bei den WT-Mäusen ist er um mehr als 30% höher, bei $42,70 \pm 9,64$ g.

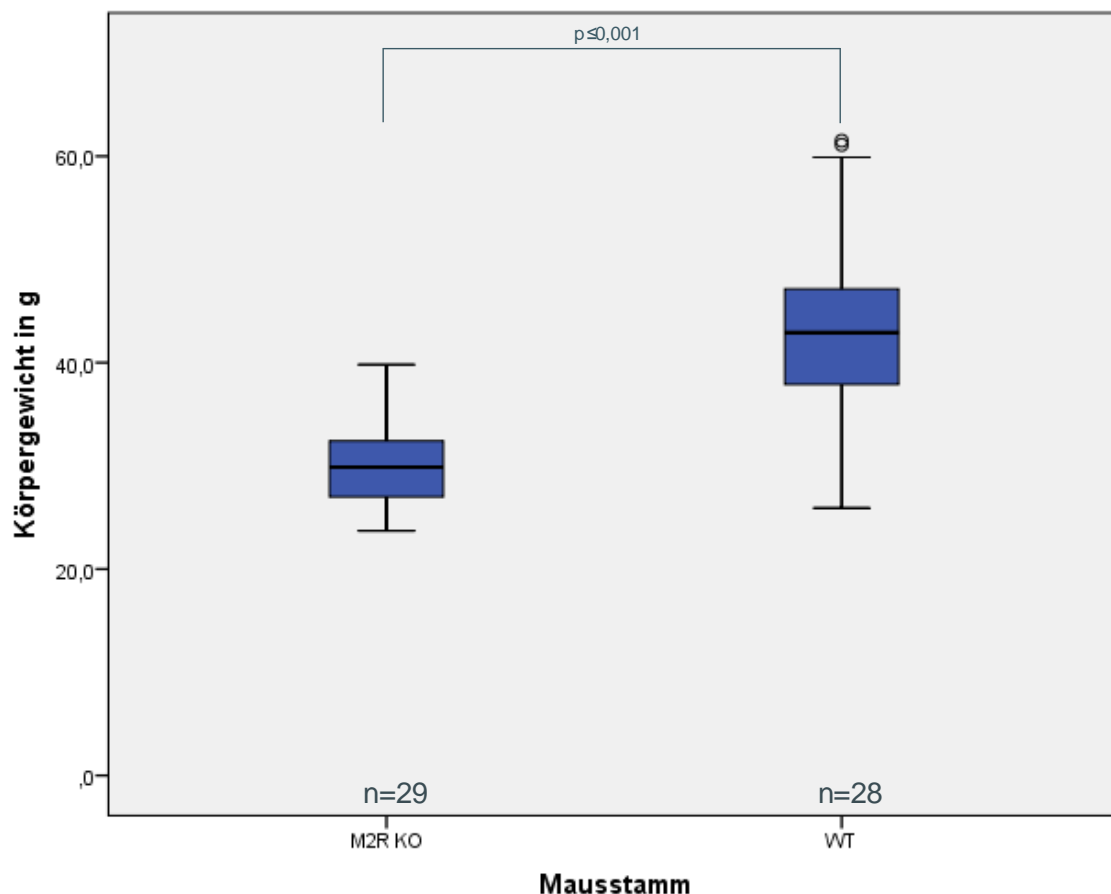


Abbildung 2: Die Körpergewichte beider Mausstämmen in g als Boxplotdarstellung. Zu sehen sind der Median (M2R KO: 29,88 g, WT: 42,9 g) sowie Quartile und Ausreißer (Kreise). Dabei weisen die Mausstämmen einen signifikanten Unterschied im Bezug auf ihr Körpergewicht auf ($p \leq 0,001$ bei 2-seitigem t-Test für unabhängige Stichproben).

° bezeichnet Ausreißer zwischen dem 1.5-fachen und dem 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt.

Das Körpergewicht der Mäuse zeigt, dass die M2R KO-Mäuse in ihrem Mittelwert unter dem der WT-Mäuse liegen. Die Daten des Magengewichtes zeigen ein gegenteiliges Bild. Hier liegt der Mittelwert in der Gruppe der M2R KO-Mäuse bei $0,95 \pm 0,59$ g, bei den WT-Mäusen bei einem Wert von $0,48 \pm 0,21$ g.

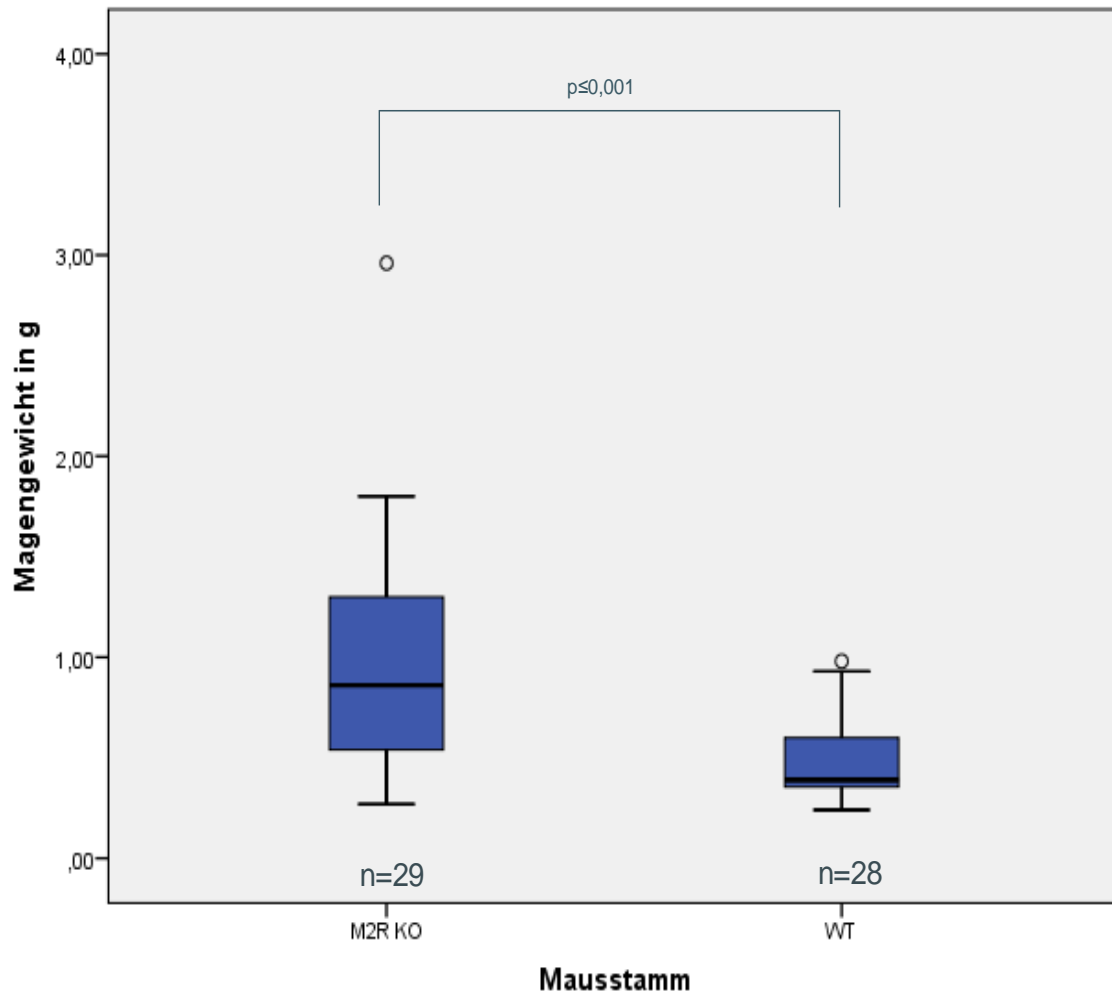


Abbildung 3: Darstellung der Magengewichte beider Mausstämme in g. Der Median liegt bei den M2R KO-Mäusen bei 0,86 g und bei den WT-Mäusen bei 0,39 g. Im Vergleich waren beide Magengewichte signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,001$, bei 2-seitigen t-Test für unabhängige Stichproben). ° bezeichnet Ausreißer zwischen dem 1.5-fachen und dem 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt.

Abbildung 4 liefert eine graphische Darstellung der Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen in Form der errechneten Quotienten. Der Maximalwert lag in der M2R KO-Gruppe bei 0,086 und bei der WT-Gruppe bei 0,023.

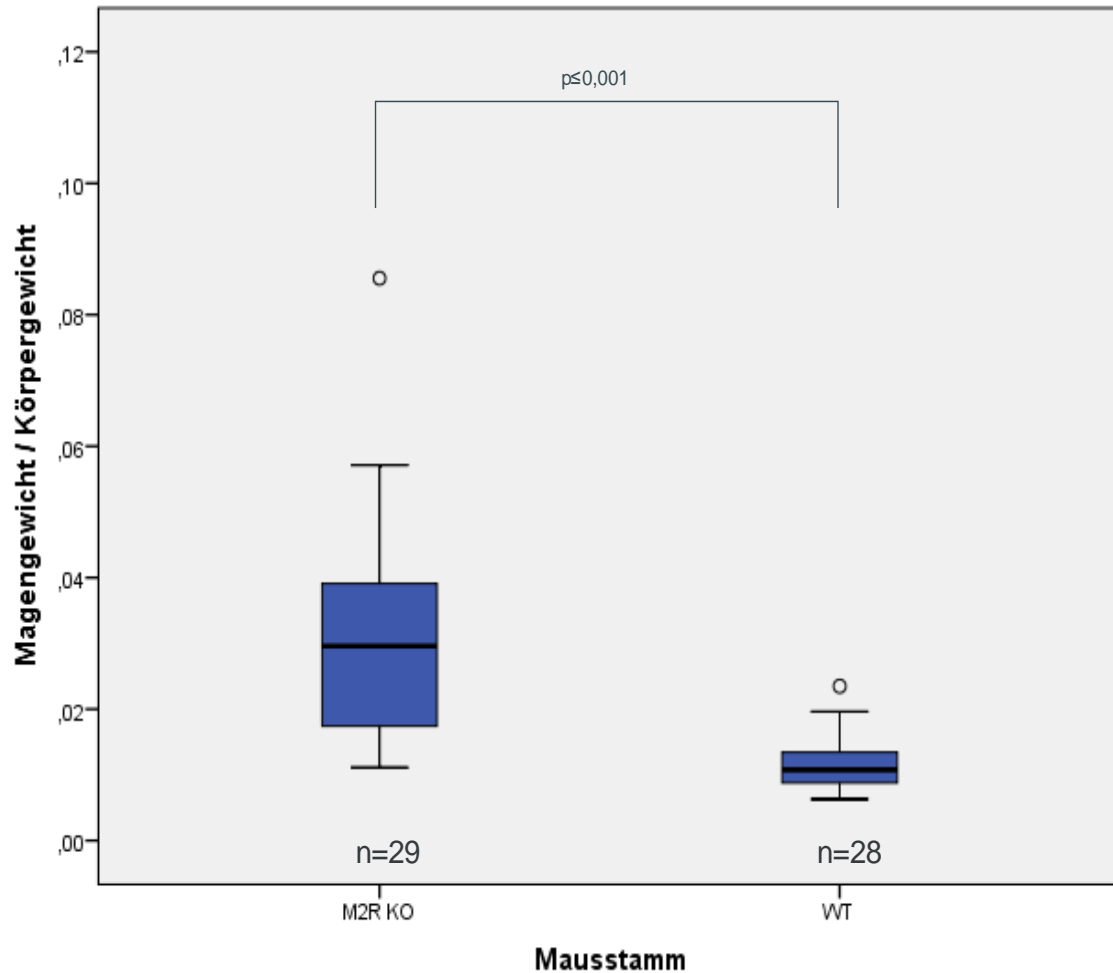


Abbildung 4: Boxplotdarstellung des Quotienten bei den M2R KO- und WT-Mäusen. Auch hier weisen beiden Mausstämme einen signifikanten Unterschied auf ($p \leq 0,001$ bei 2-seitigen t-Test für unabhängige Stichproben). Der Median lag bei den M2R KO-Mäusen bei 0,03 und bei den WT-Mäusen bei 0,01. ° bezeichnet Ausreißer zwischen dem 1.5-fachen und dem 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt.

Nach der Unterteilung in Gruppen nach Mausstämme erfolgte eine weitere Unterteilung in eine Gruppe jünger als 250 Tage und eine Gruppe älter als 250 Tage innerhalb jeden Mausstammes. Grund dieser Aufteilung war, wie in Abbildung 5 ersichtlich, die altersabhängige Entwicklung des Magengewichtes darzustellen.

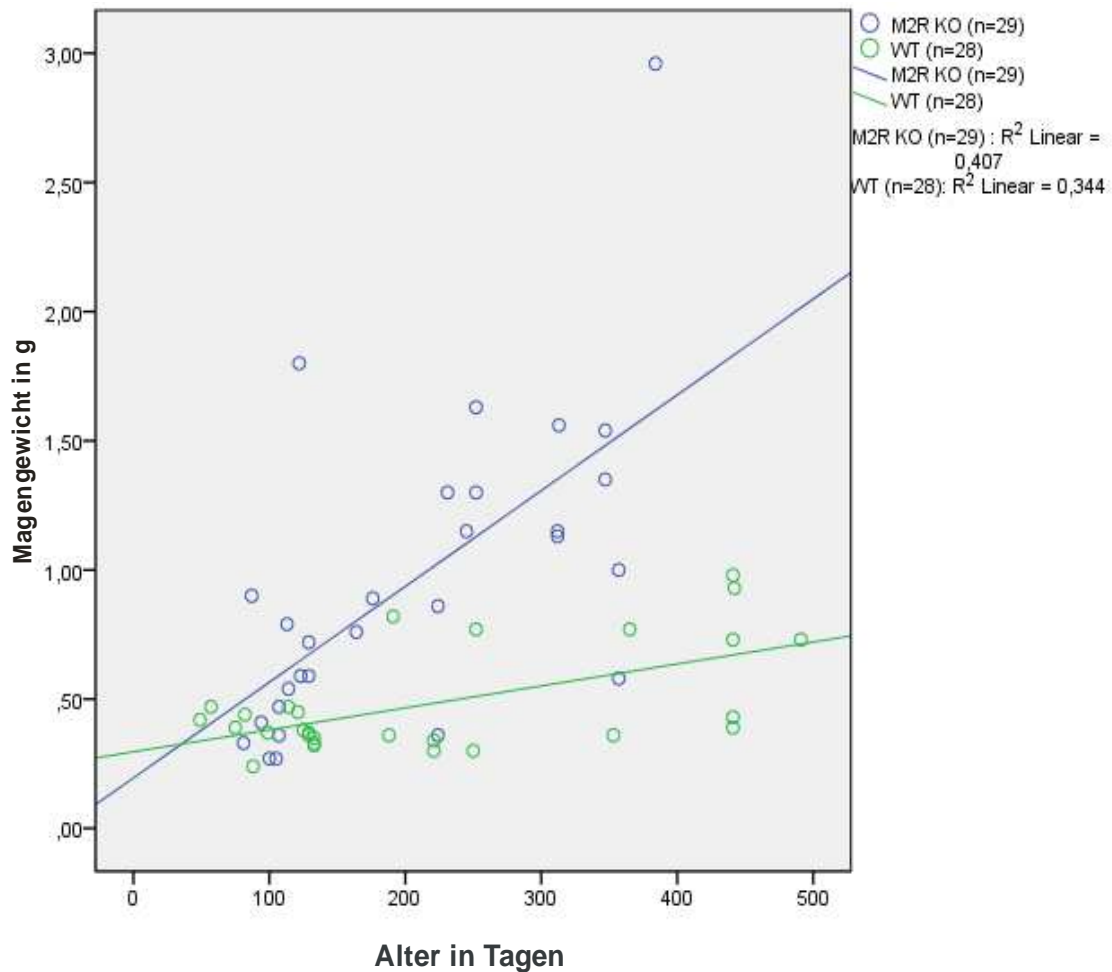


Abbildung 5: Punktwolke der Magengewichte innerhalb der Mausstämme bei aufsteigendem Alter

Bei genauerer Betrachtung der Gewichte innerhalb der Altersgruppen zeigt die Gruppe der WT-Mäuse höhere Werte beim Körpergewicht und erniedrigte Werte beim Magengewicht gegenüber den M2R KO-Mäusen. In der Gruppe der älteren Tiere war dieser Unterschied deutlicher ausgeprägt als bei den jungen Tieren. Die Abbildungen 6 und 7 stellen diesen Unterschied graphisch dar. Der 2-seitige t-Test für unabhängige Stichproben zeigte dabei einen signifikanten Unterschied im Körpergewicht bei den beiden Mausstämmen, sowohl bei den Mäusen jünger als 250 Tage als auch bei denen älter als 250 Tage ($p \leq 0,001$ bzw. $p = 0,001$). In Form von Werten stellt sich die Situation wie folgt dar: der Mittelwert des Körpergewichtes der Gruppe <250 Tagen bei den M2R KO-Mäusen beträgt $28,26 \pm 3,56$ g, bei den gleichaltrigen WT-Mäusen liegen die Werte bei $39,47 \pm 8,67$ g. Der Mittelwert der Altersgruppe >250 Tage beträgt bei den M2R KO-Mäusen $33,60 \pm 3,23$ g, während er bei den WT-Mäusen bei $48,51 \pm 8,86$ g liegt (Abbildung 6).

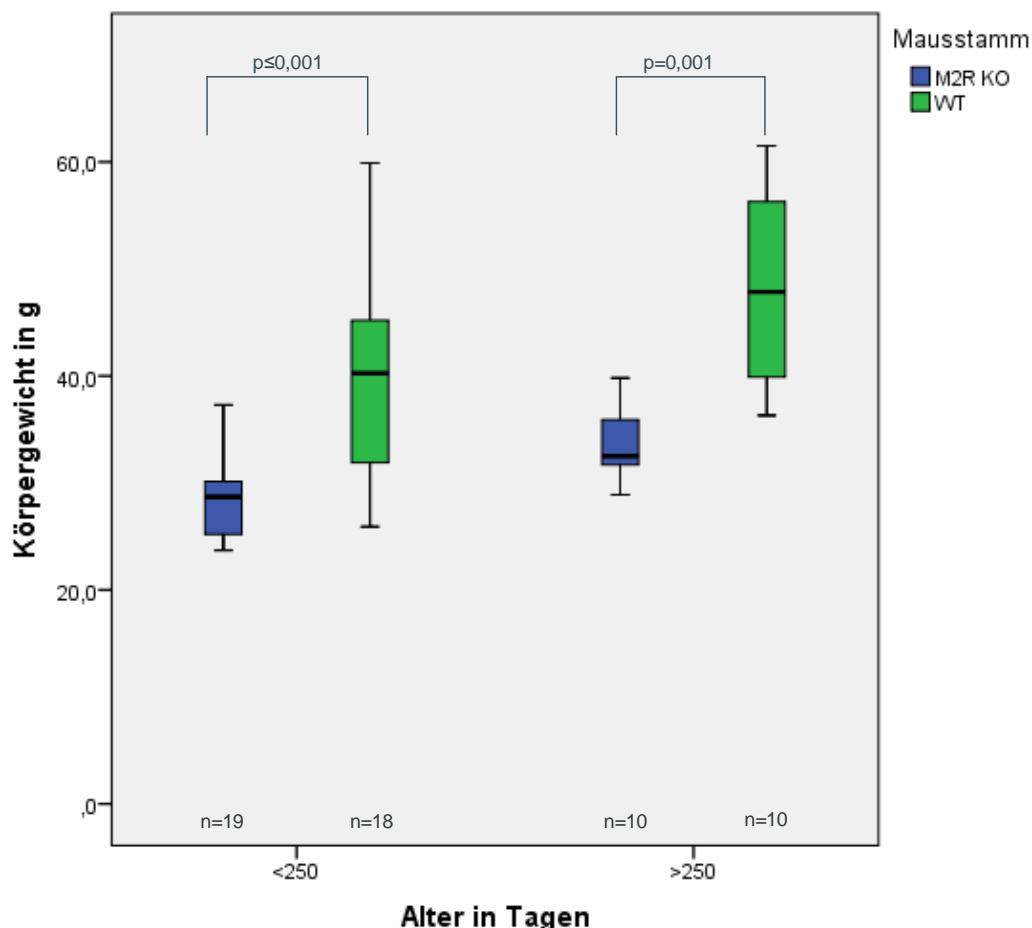


Abbildung 6: Vergleich der Körpergewichte der Mausstämmen bei den einzelnen Altersgruppen. Die Mediane betrugen in der Gruppe <250 Tage bei den M2R KO-Mäusen 28,7 g, bei den WT-Mäusen 32,5 g. In der Gruppe >250 Tage 33,6 g bzw. 48,5 g. Dabei war in beiden Altersgruppen der Unterschied signifikant ($p \leq 0,001$ bzw. $p = 0,001$ bei 2-seitigem t-Test für unabhängige Stichproben).

Auch das Magengewicht zwischen den beiden Altersgruppen weist signifikant unterschiedliche Werte auf ($p=0,004$ bzw. $p=0,003$). So beträgt es bei den M2R KO-Mäusen <250 Tage im Mittel $0,70 \pm 0,4$ g, während die WT-Mäuse im Mittel ein Magengewicht von $0,40 \pm 0,21$ g hatten. Die Gruppe der älteren Mäuse weist einen Wert von $1,42 \pm 0,62$ g, bzw. einen Wert von $0,64 \pm 0,25$ g auf (Abbildung 7).

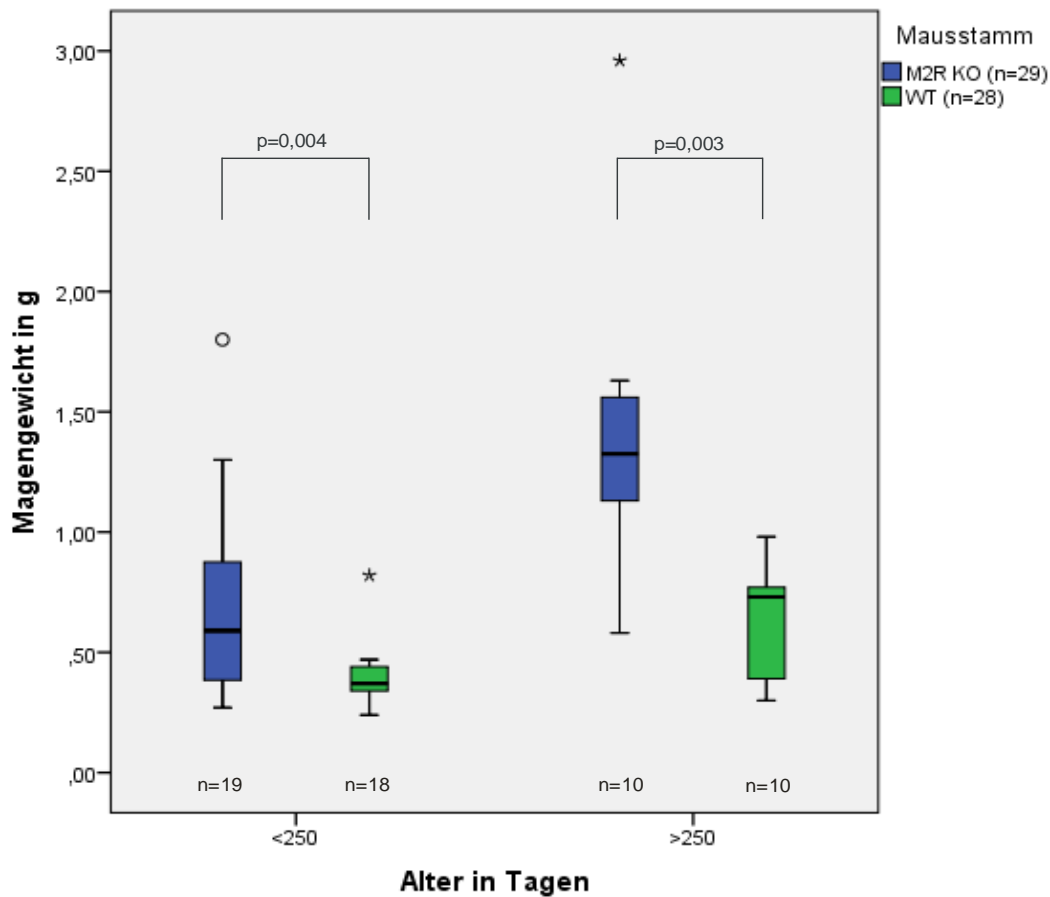


Abbildung 7: Vergleich der Magengewichte der Mäuse bei den einzelnen Altersgruppen. In den Altergruppen zeichnen sich signifikante Unterschiede im Bezug auf das Magengewicht ab ($p=0,004$ bzw. $p=0,003$, bei 2-seitigem t-Test für unabhängige Stichproben). Die Mediane betrugen dabei in der Altersgruppe <250 Tage 0,59 g bzw. 1,325 g und in der Gruppe >250 Tage 1,325 g bzw. 0,73 g. ° bezeichnet Ausreißer zwischen dem 1,5-fachen und dem 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt. * bezeichnet Extremwerte mit mehr als dem 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt.

Aufgrund der Unterschiede in den Werten für das Körper- und Magengewicht zeigen auch die Quotienten signifikante Unterschiede. So betrug der Mittelwert des Quotienten bei den M2R KO-Mäusen <250 Tage 0,024, bei der jungen Gruppe der WT-Mäuse lag er bei 0,01. Die Standardabweichung lag bei 0,012 bzw. 0,02. Die Mittelwerte des Quotienten bei den Mäusen älter als 250 Tage waren deutlich höher. So lag er bei den M2R KO-Mäusen bei 0,04 und bei den WT-Mäusen bei 0,01. Die Standardabweichungen lagen bei 0,02 bzw. bei 0,01. Vergleichend ist festzustellen, dass in beiden Altersgruppen die M2R KO-Mäuse einen höheren Quotienten aufweisen als die Gruppe der WT-Mäuse. Weiterhin steigt der Quotient bei beiden Mausgruppen im Alter an, bei den M2R KO-Mäusen allerdings stärker als bei den WT-Mäusen. Abbildung 8 stellt dies graphisch dar.

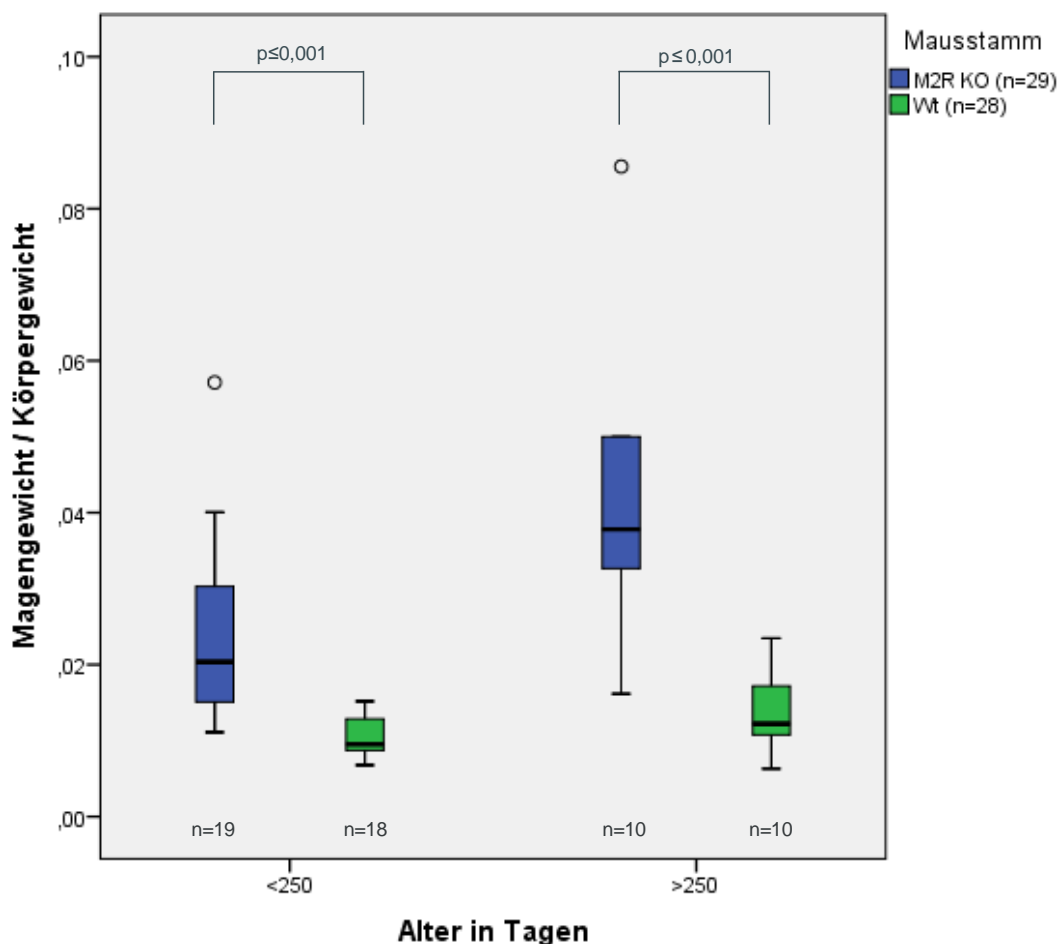


Abbildung 8: Boxplotdarstellung des Magenquotienten, aufgeteilt in Altersgruppen. Auch die Quotienten weisen einen signifikanten Unterschied zwischen den Mausstämmen in den Altersgruppen auf ($p \leq 0.001$ bzw. $p \leq 0.001$). Die Mediane in der Altersgruppe <250 Tage lagen bei 0,02 bzw. 0,01. In der Gruppe >250 Tage betrugen sie 0,04 bzw. 0,01. ° bezeichnet Ausreißer zwischen dem 1.5-fachen und dem 3-fachen Interquartilsabstand vom Median entfernt.

3.2 Immunhistochemische Befunde

3.2.1 Ösophagus

Für jeden Organabschnitt wurde jeweils die Spezifität des Antikörpers gegen den M2R ausgetestet. Im Ösophagus zeigte sich nur eine Immunreaktion in dem Gewebe der Wildtyp-Maus, während in der korrespondierenden für M2R und M3R gendefizienten Maus eine unspezifische Markierung von Epithelzellen zu erkennen war. Die im Wildtyp spezifisch M2R-markierten Zellen befanden sich in der Tunica muscularis sowohl im Stratum circulare als auch im Stratum longitudinale, wobei es ein vermehrtes Vorkommen im Stratum circulare zu geben schien. Im korrespondierenden Knockouttier waren diese Zellen nicht zu sehen (Abbildung 9).

Die Doppelimmunfluoreszenzen mit den Antikörpern gegen M2R und α SMA zeigten, dass bei es sich bei diesen M2R-markierten Zellen um glatte Muskelzellen innerhalb der Tunica muscularis handelte. Glatte Muskelzellen der Gefäßwand und der Lamina muscularis mucosae exprimierten den M2R nicht (Abbildung 10 und 11). Dies verdeutlichten auch die CLSM-Aufnahmen (Abbildung 12). Im Überlagerungsbild (A`` und B``) erscheinen doppelt angefärbte Zellen jeweils gelblich. Diese lagen auch hier ausschließlich in der Tunica muscularis. Eine weitere Doppelimmunfluoreszenz wurde mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1, einem Marker für Endothelzellen durchgeführt (Abbildung 13). Auch hier fanden sich M2R-markierte Zellen vermehrt in der zirkulären Muskulatur, während in der Lamina muscularis mucosae und der Tela submucosa kein Signal zu erkennen war. Eine Co-Lokalisation mit dem Endothelzellmarker zeigte sich weder in der Epifluoreszenzmikroskopie noch im CLSM (Abbildung 14).

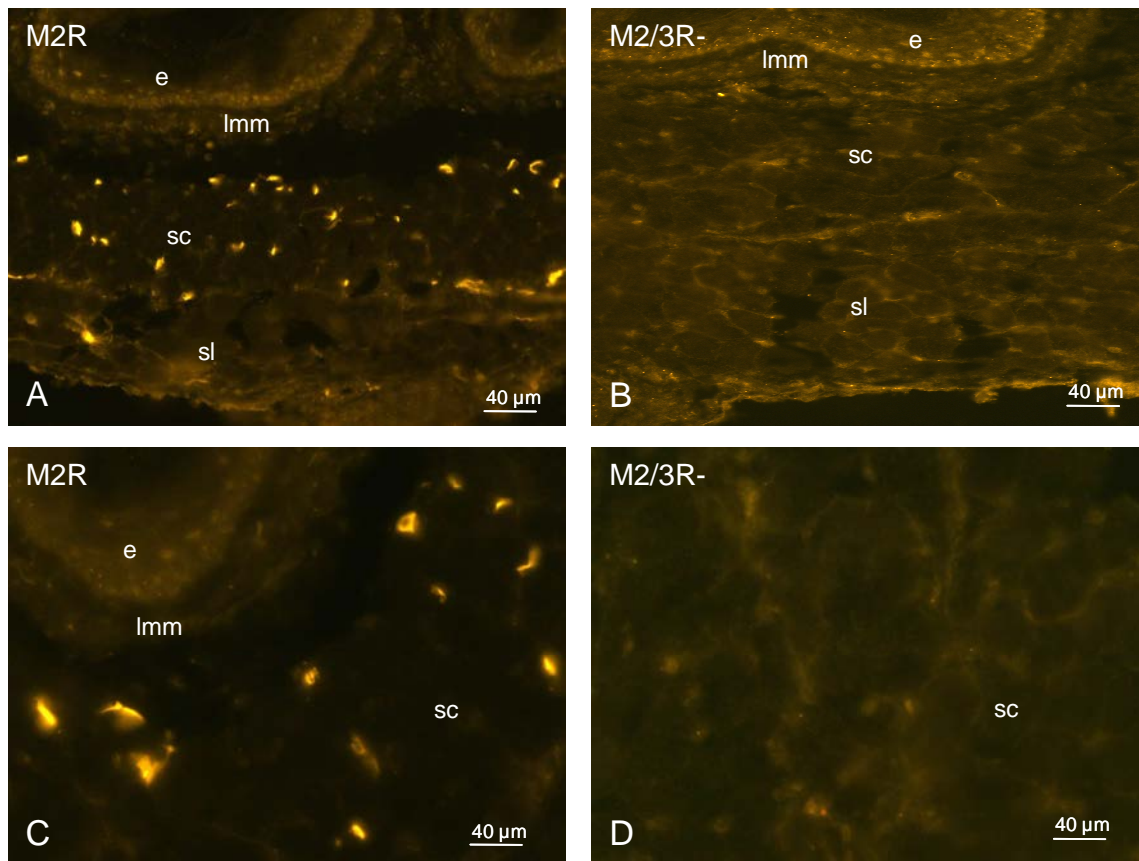


Abbildung 9: Ösophagus, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

In Bild A sind in der Tunica muscularis markierte Zellen sowohl im Stratum circulare (sc) als auch im Stratum longitudinale (sl) zu erkennen. Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae (Imm) sind nicht immunreaktiv. Im korrespondierenden KO-Tier sind diese Zellen nicht zu sehen (Bilder B und D). Eine unspezifische, da auch im Knockouttier vorhandene, Immunreaktivität zeigen basale Epithelzellen (e, Bild B).

Bild C zeigt eine Vergrößerung des Stratum circulare (sc) mit Anteilen der Tunica mucosa aus einer Wildtyp-Maus. Die Vergrößerungsaufnahme D zeigt einen Abschnitt des Stratum circulare (sc) aus dem KO-Tier, in der keine Immunfluoreszenz zu erkennen ist.

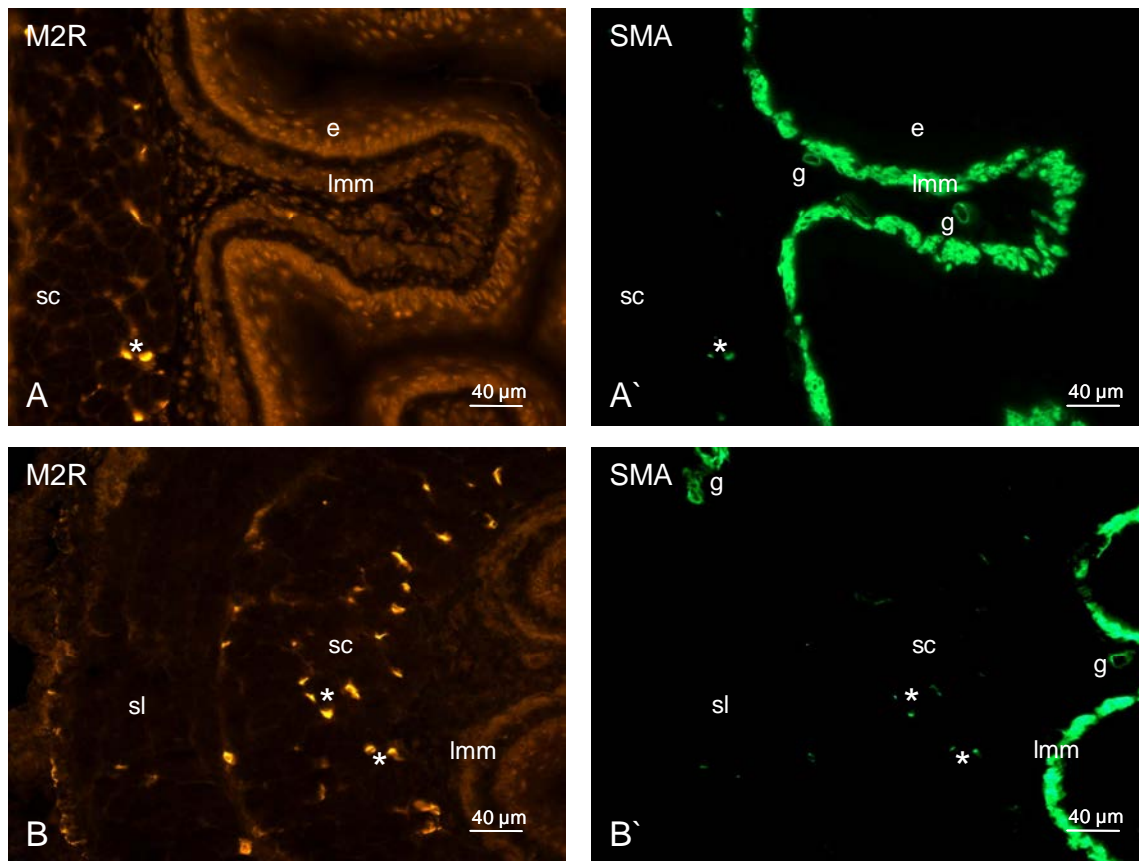


Abbildung 10: Ösophagus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Die Bilder A und A' zeigen einen identischen Schnitt durch den Epithelbereich (e) und das Stratum circulare (sc), während die Bilder B und B' einen kompletten Querschnitt aller Wandschichten durch den Ösophagus zeigen. Es finden sich viele M2R-markierte Zellen in der Tunica muscularis, deutlich mehr im Stratum circulare (sc) als im Stratum longitudinale (sl). Die in den Bildern A' und B' markierte Lamina muscularis mucosae (Imm) und die Gefäßmuskulatur (g) zeigen keine M2R-Immunreaktion. Mit Sternchen gekennzeichnete Zellen sind doppelt angefärbt.

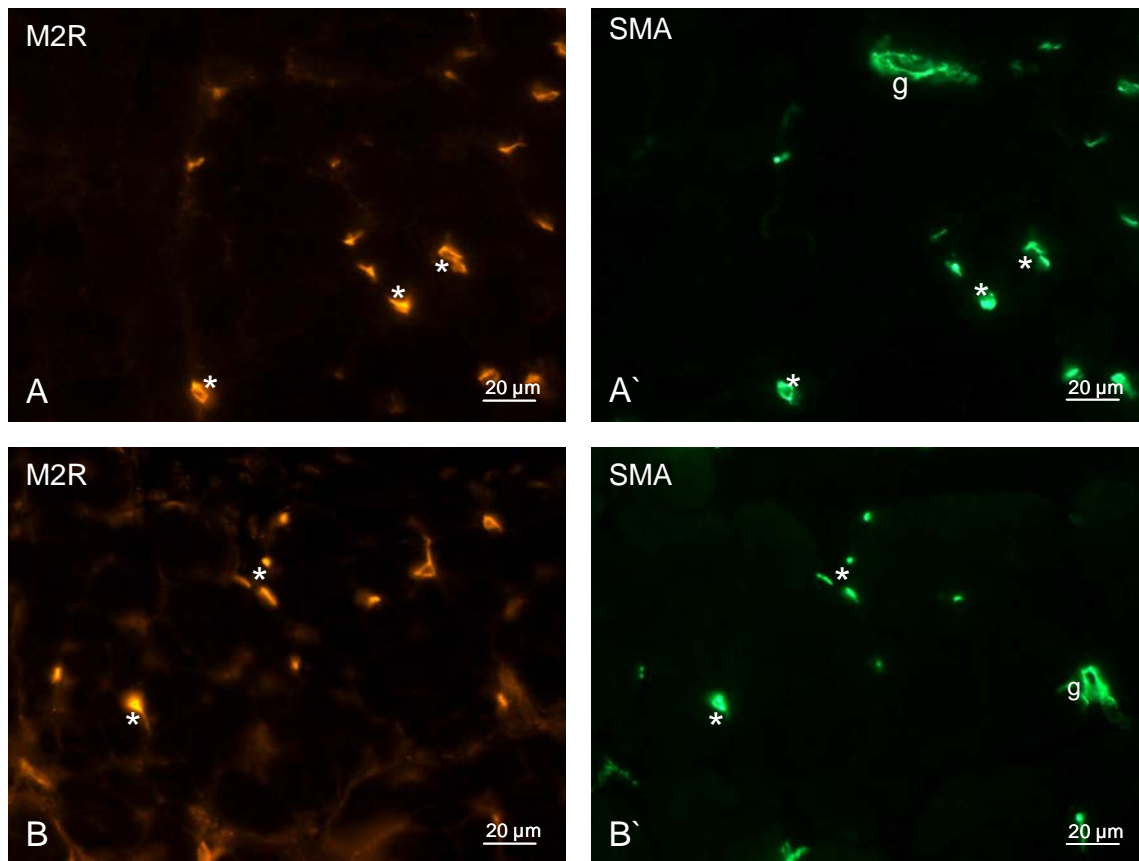


Abbildung 11: Ösophagus, Stratum circulare, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Die Bilder A und A' sowie B und B' zeigen Vergrößerungen aus dem Stratum circulare. In der Vergrößerung erkennt man immunreaktive Zellen (Sternchen) in der Muskulatur sowie das Fehlen von M2R-Immunreaktivität an der Oberfläche von Gefäßmuskulzellen (g).

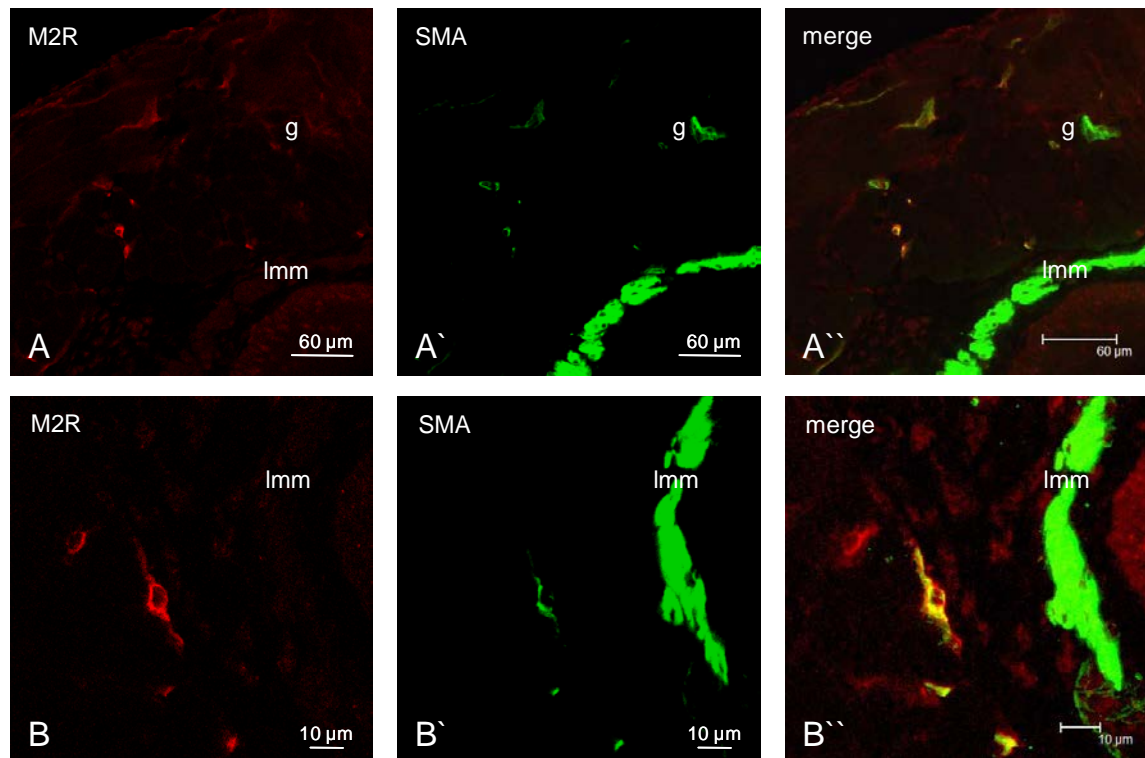


Abbildung 12: Ösophagus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA, CLSM-Aufnahme

Zellen mit M2R sind rot, glatte Muskelzellen grün dargestellt, doppelt angefärbte Zellen erscheinen gelblich. Fast alle M2R-positiven Zellen innerhalb der Tunica muscularis sind α SMA-positiv, während in der Lamina muscularis mucosae sowie in der Gefäßmuskulatur keine M2R-positiven Zellen vorkommen.

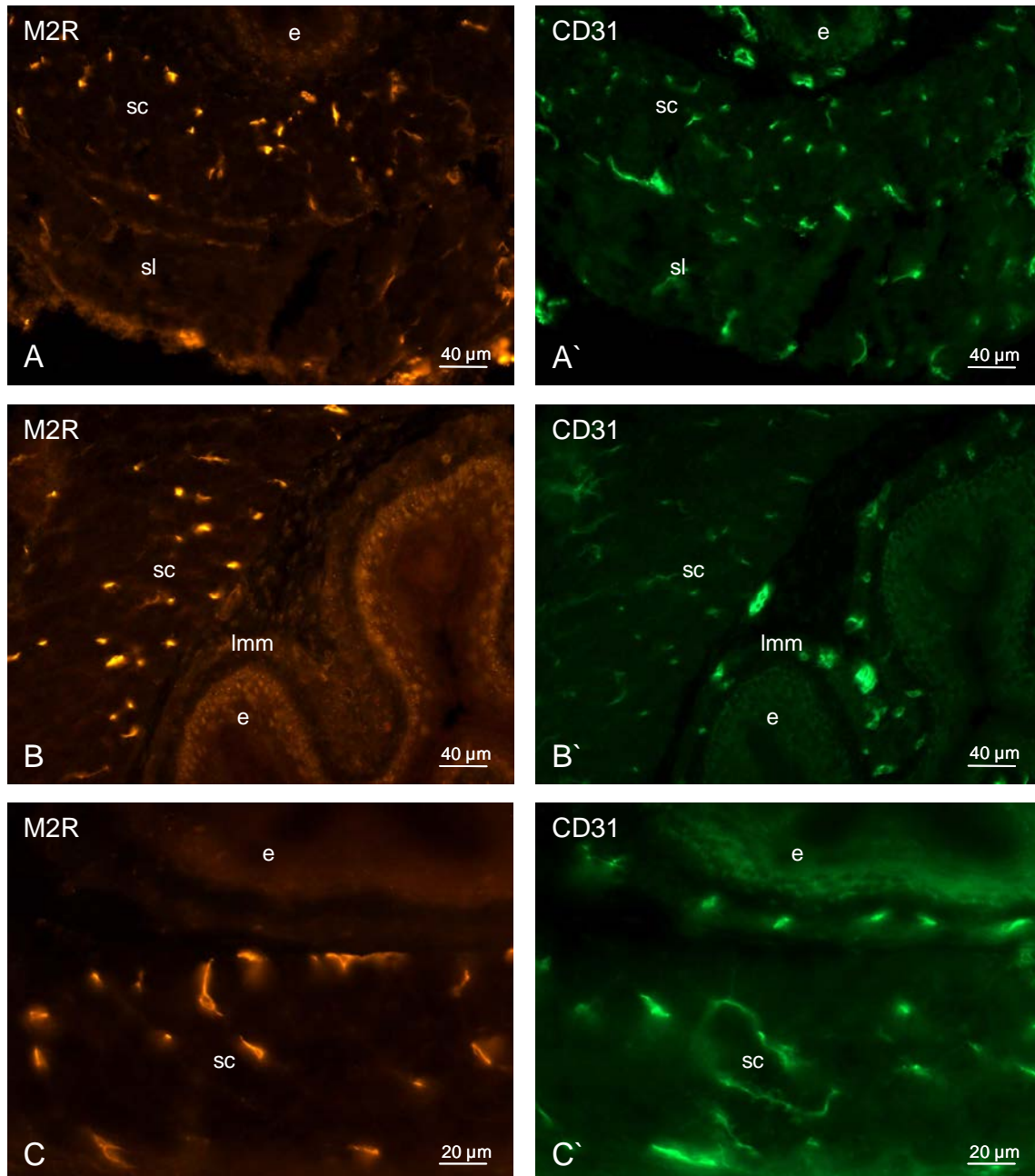


Abbildung 13: Ösophagus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31), einem Endothelzellmarker

Die Bilder A, A' und B, B' zeigen die Lokalisation von M2R (rot) und CD31 positiven Endothelzellen (grün) im Ösophagus einer Wildtypmaus. Es finden sich im Stratum circulare (sc) mehr M2R markierte Zellen als im Stratum longitudinale (sl) der Tunica muscularis, während in der Lamina muscularis mucosae (Imm) sowie in der Tela submucosa kein Signal zu erkennen ist. Eine Co-Lokalisation mit PECAM-1 gibt es nicht. Bild B zeigt die unspezifische Fluoreszenz von basalen Epithelzellen (e). Eine Vergrößerung des Abschnittes vom Epithel (e) bis zur zirkulären Muskulatur (sc) des Ösophagus zeigen die Bilder C und C'. Die einzeln in der Tunica muscularis liegenden

M2R-positiven Zellen werden nicht von dem Endothelzellmarker Anti-PECAM-1 erkannt.

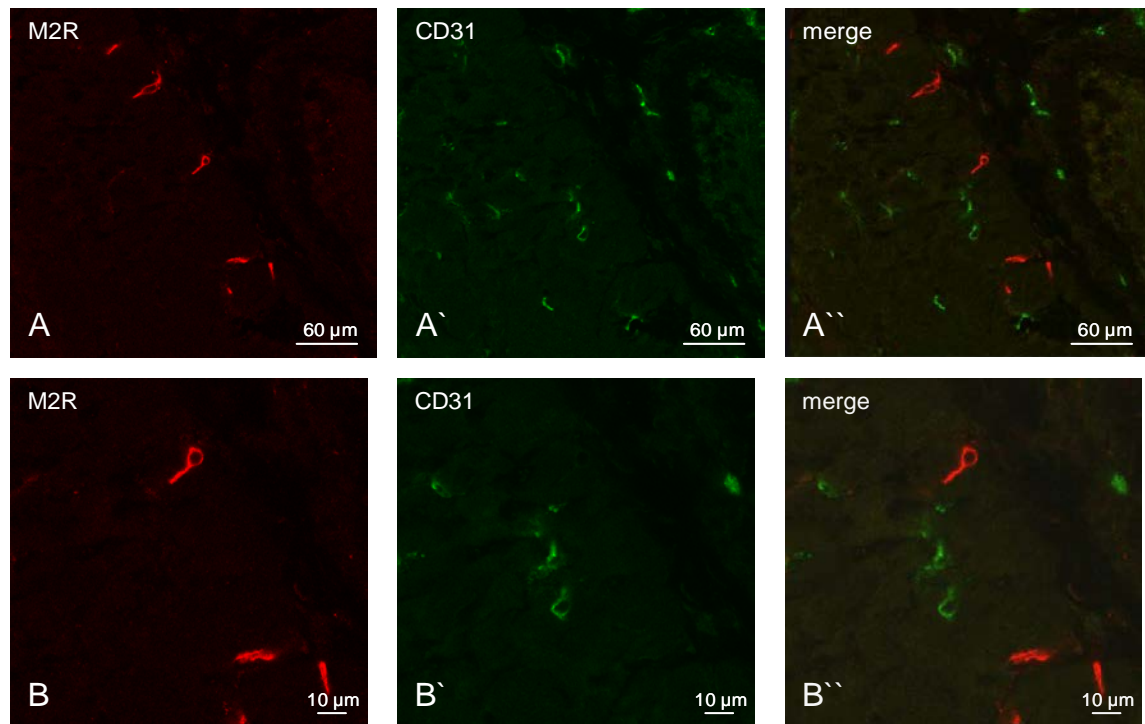


Abbildung 14: Ösophagus, Tunica muscularis, CLSM-Aufnahme

Es besteht keine Co-Lokalisation zwischen dem M2R (rot) und PECAM-1 (grün) in der Tunica muscularis.

3.2.2 Fundus gastricus

Auch im Magenfundus erfolgte eine Austestung der Spezifität des verwendeten M2R-Antikörpers. Es zeigte sich eine deutliche Immunreaktion im Bereich der Tunica muscularis, eine schwache der Lamina muscularis mucosae sowie eine wiederum deutliche für subepitheliale Zellen in der Tunica mucosa. Im Knockouttier waren diese Markierungen nicht aufzufinden. Hier bestand lediglich eine unspezifische Markierung im Bereich des Mesothels und des unverhornten Plattenepithels (Abbildung 15). Die Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA zeigte eine deutliche Co-Lokalisation in der Tunica muscularis. Die Lamina muscularis mucosae, welche aus glatten Muskelzellen gebildet wird, zeigte für den M2R nur eine sehr schwache Immunreaktion. Glatte Gefäßmuskelzellen in der Tela submucosa zeigten keine Doppelmarkierung. Die in der Tunica mucosa gelegene Myozyten der Muskelpumpe reichten von der Lamina muscularis mucosa bis in den lumennahen Bereich und wurden durchgehend mit dem α SMA Antikörper markiert. Ebenfalls lagen M2R-exprimierende Zellen in der Lamina propria mucosae direkt unterhalb des Epithels (Abbildung 16). Die Vergrößerungsaufnahmen dieses Bereiches zeigten, dass diese immunreaktiven Zellen keine glatten Muskelzellen waren, da diese das subepitheliale Gebiet nur einzeln erreichten und nicht M2R- immunreaktiv waren (Abbildung 17). Die Doppelimmunfluoreszenz mit den Antikörpern gegen den M2R und PECAM-1 zeigte, dass es sich bei diesen in unmittelbarer Nähe des Oberflächenepithels angefärbten Zellen um Endothelzellen handelte, da diese eine deutliche Co-Lokalisation zeigten. Die in der Tunica muscosae gelegenen Glandulae gastricae banden den PECAM-1 Antikörper unspezifisch (Abbildung 18 und 19). Endothelzellen innerhalb der Tunica muscularis oder der Tela submucosa banden den M2R-Antikörper nicht (Abbildung 17).

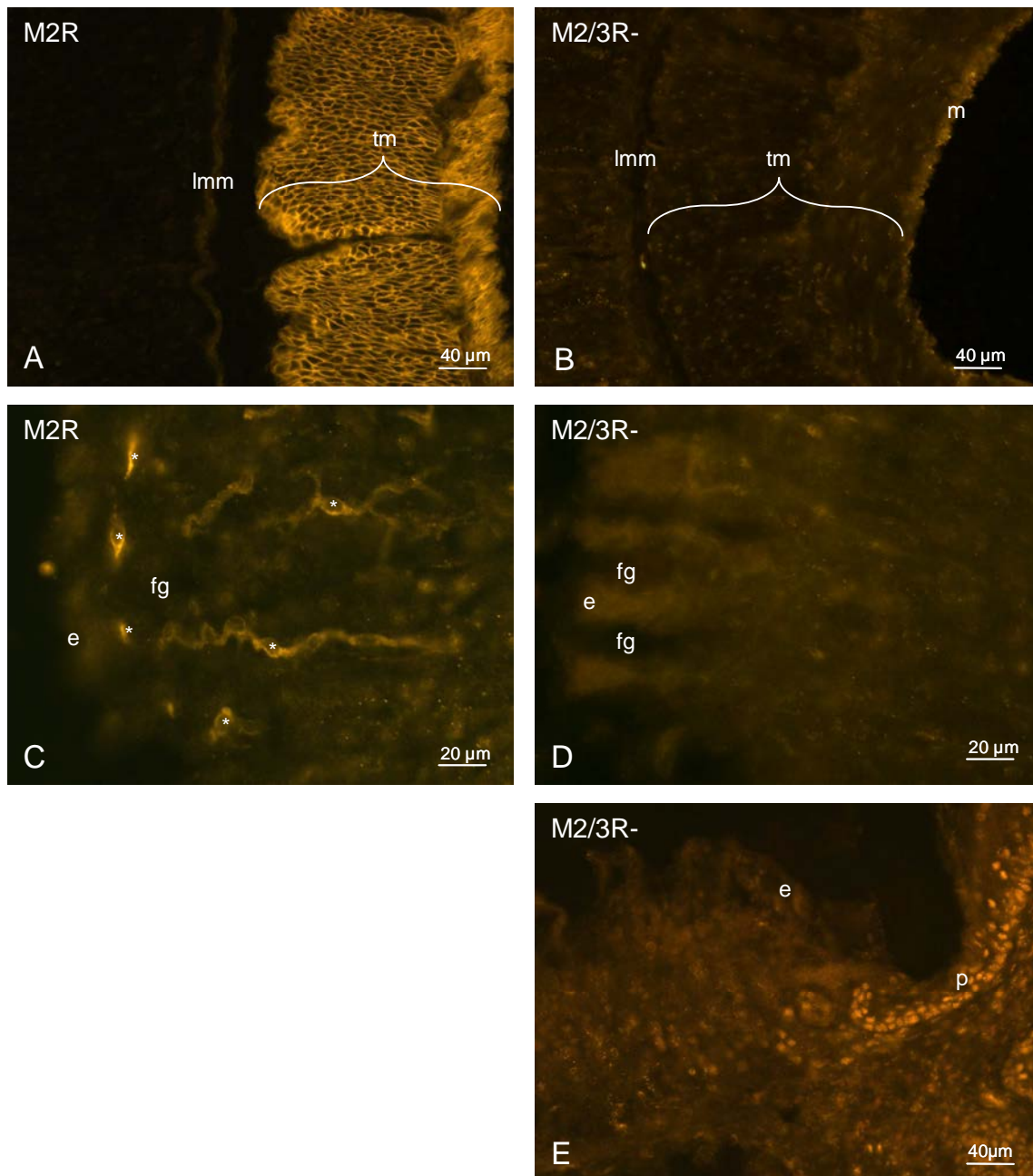


Abbildung 15: Magen, Fundus, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Im Wildtyp sind Zellen in der Tunica muscularis (tm) deutlich, in der Lamina muscularis mucosae (Imm) schwach (Bild A), sowie subepitheliale Zellen (e, Oberflächenepithel) und Zellen in der Lamina propria mucosae (Sternchen Bild C), welche unmittelbar neben den Foveolae gastricae (fg) liegen, mit dem M2R-Antikörper markiert. Im KO-Tier sind in vergleichbaren Fundusabschnitten nur unspezifisch angefärbte Zellen am Mesothel (m) sichtbar (Bild B). Weder subepitheliale Zellen noch Zellen in der Lamina propria mucosae sind im KO-Tier markiert (Bild D). Bild E zeigt die Übergangsregion vom Vormagen in den Magenfundus. Diese ist am verhornten Plattenepithel (p) zu erkennen, welches unspezifisch angefärbt ist.

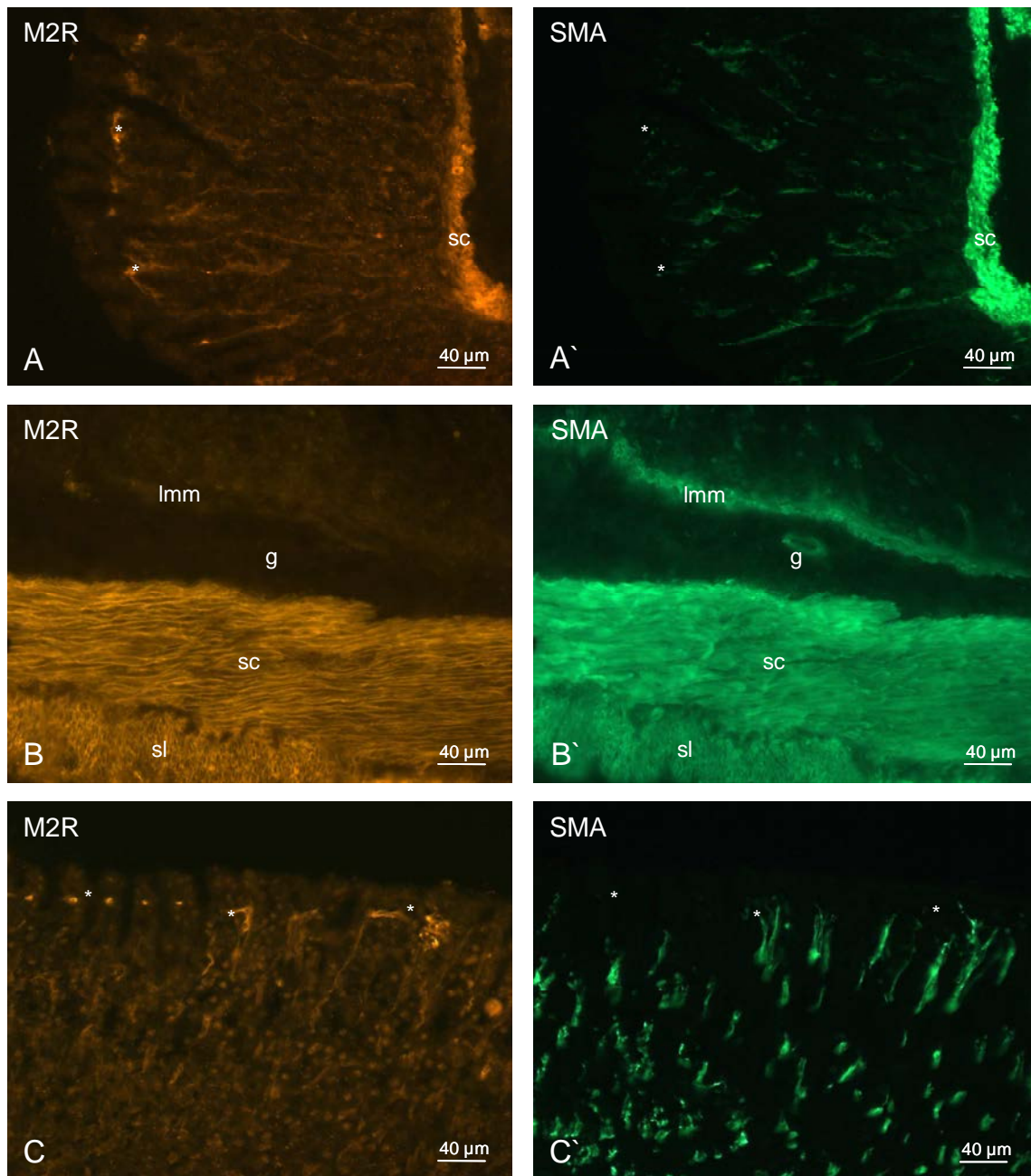


Abbildung 16: Magen, Fundus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

In den Bildern A und A' sieht man ein doppelt markiertes Stratum circulare (sc) der Tunica muscularis sowie in der Tunica mucosa angefärbte Myozyten der Muskelpumpe und M2R-markierte Zellen unmittelbar unterhalb der Lamina epithelialis mucosae (Sternchen). Die Aufnahmen B, B' verdeutlichen, dass nur in der Tunica muscularis (Stratum circulare sc, Stratum longitudinale, sl), aber weder in der Lamina muscularis mucosae (Imm), noch in der Gefäßmuskulatur (g) M2R-positive Zellen liegen. Der M2R wird in der Tunica mucosa zusätzlich von Zellen, welche direkt unter dem Epithel liegen, exprimiert (Sternchen in den Bildern A und C).

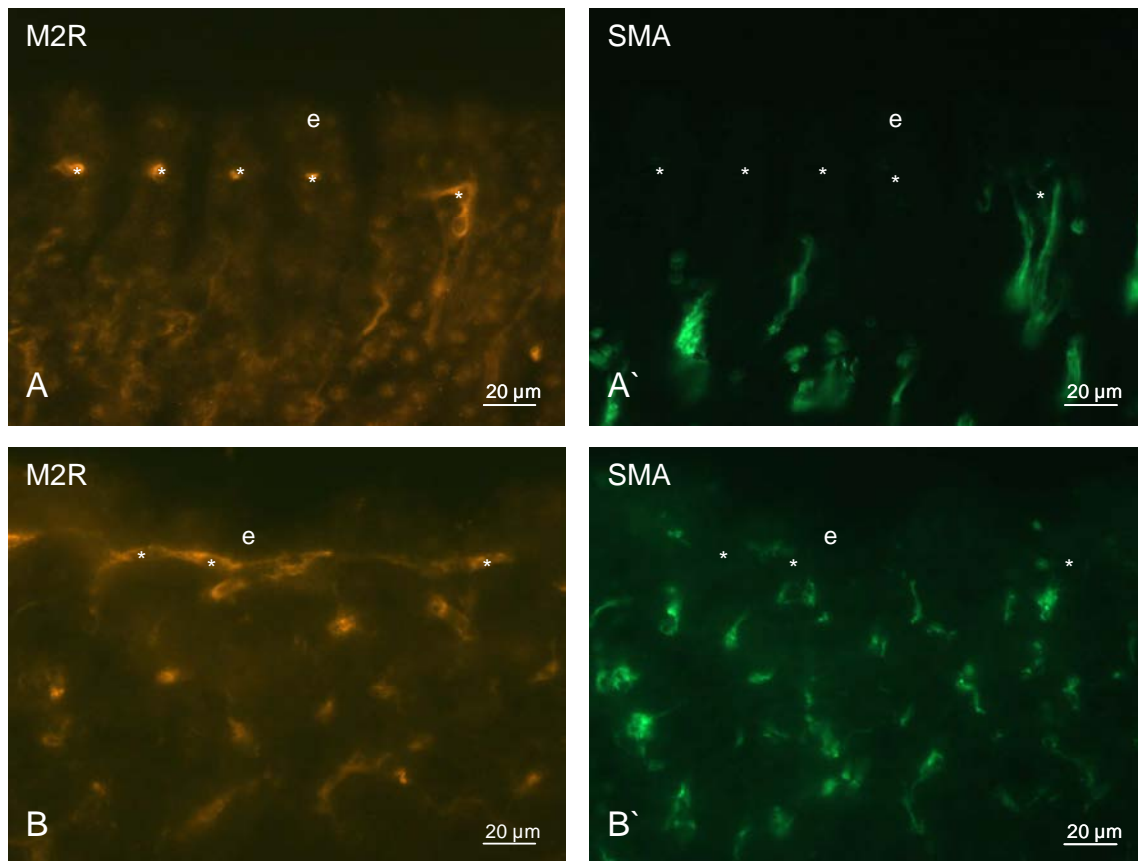


Abbildung 17: Magen, Fundus, Vergrößerung des adluminalen Bereiches der Lamina propria mucosae, Doppelimmunfluoreszenz mit den Antikörpern gegen M2R und α SMA

M2R-exprimierende Zellen (Sternchen) liegen in der Lamina propria mucosae, direkt unterhalb des Oberflächenepithels (e). Glatte Muskelzellen erreichen das subepitheliale Gebiet nur vereinzelt; diese sind nicht M2R-immunreaktiv.

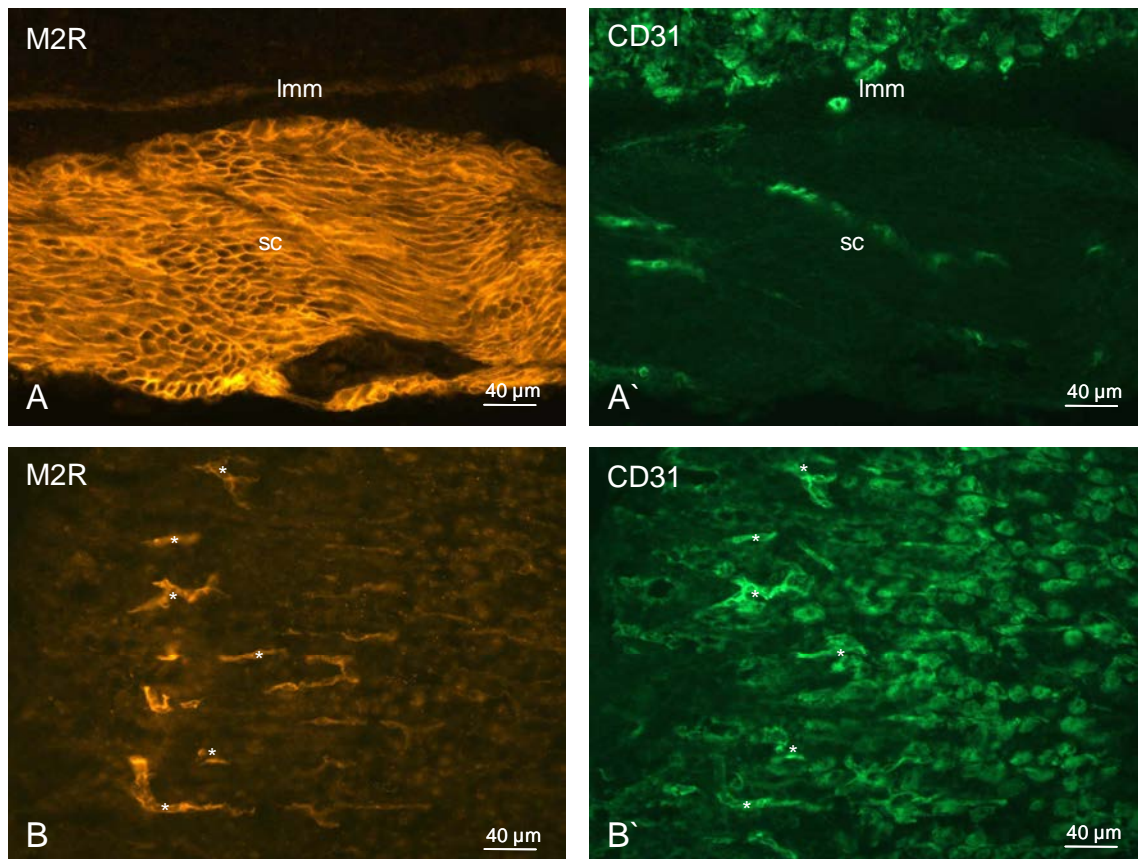


Abbildung 18: Magen, Fundus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Das Stratum circulare (sc) der Tunica muscularis ist deutlich für den M2R immunreaktiv, die Lamina muscularis mucosae (Imm) nur schwach (Bild A). PECAM-1 markierte Endothelzellen sind nur vereinzelt in der Tunica muscularis vorhanden (Bild A'). Vereinzelt im mittleren, besonders aber im epithelnahen Drittel der Tunica mucosa, wird der M2R exprimiert (Sternchen in Bild B). In der Tunica mucosa binden die Glandulae gastricae unspezifisch den CD31 Antikörper. Erkennbar ist aber, dass die adluminal gelegenen M2R-positiven Zellen auch den CD31-Antikörper binden (Sternchen in Bild B').

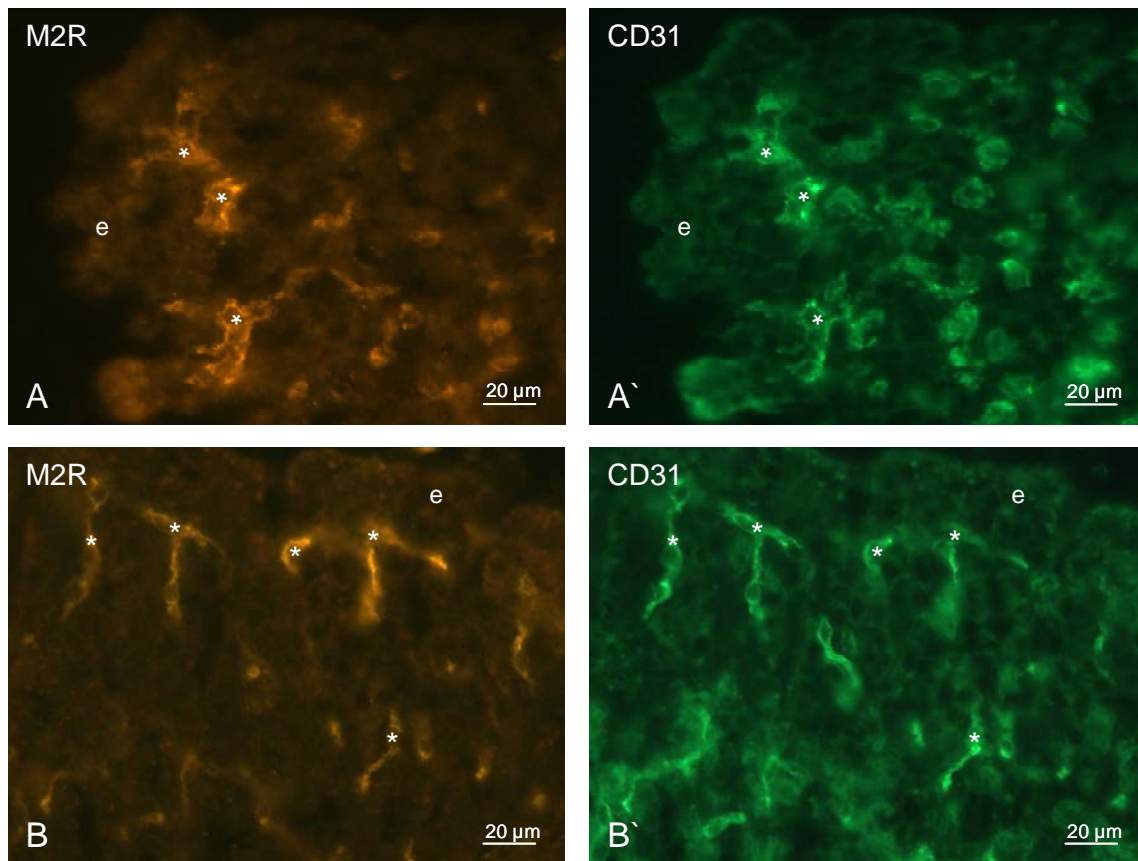


Abbildung 19: Magen, Fundus, Vergrößerung des adluminale Bereiches, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Die Bilder A, A' und B, B' zeigen eine deutliche Co-Lokalisation (Sternchen) beider Markierungen in der Lamina propria unmittelbar unter dem Oberflächenepithel (e).

3.2.3 Pylorus

Die Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper zeigte in der Wildtypmaus, wie auch im Fundus gastricus, eine deutliche Anfärbung der zirkulären Muskulatur sowie subepithelialer Zellen (Abbildung 20, Bilder A und C). Die Lamina muscularis mucosae wurde auch hier nur in geringem Maße markiert (Abbildung 20, Bild A). Entsprechende Pylorusregionen aus einer M2R/M3R-gendefizienten Maus zeigten keinerlei Immunreaktion (Abbildung 20, Bilder B und D). Die Doppelimmunfluoreszenz in diesem Magenabschnitt mit den Antikörpern gegen M2R und α SMA zeigte eine Doppelmarkierung der glatten Muskelzellen in der Tunica muscularis und der Lamina muscularis mucosae (Abbildung 21, Bilderpaar A, A'). Die direkt unter dem Oberflächenepithel liegenden M2R-immunreaktive Zellen waren jedoch keine glatten Muskelzellen. Dies verdeutlichen die Vergrößerungsaufnahmen (Abbildung 21, Bildpaar B, B'). Dort erkennt man, dass die Myozyten der Muskelpumpe nicht den M2R exprimierten. Hingegen wurden Endothelzellen durch den M2R-Antikörper und den PECAM-1-Antikörper markiert (Abbildung 22, Bilder B und B'). Die in der Tela submucosa gelegenen Endothelzellen der Gefäßmuskulatur wurden hingegen nicht mit dem M2R-Antikörper markiert (Abbildung 22, Bildpaar A, A'). Die Analyse mit dem CLSM bestätigte diesen Befund (Abbildung 23).

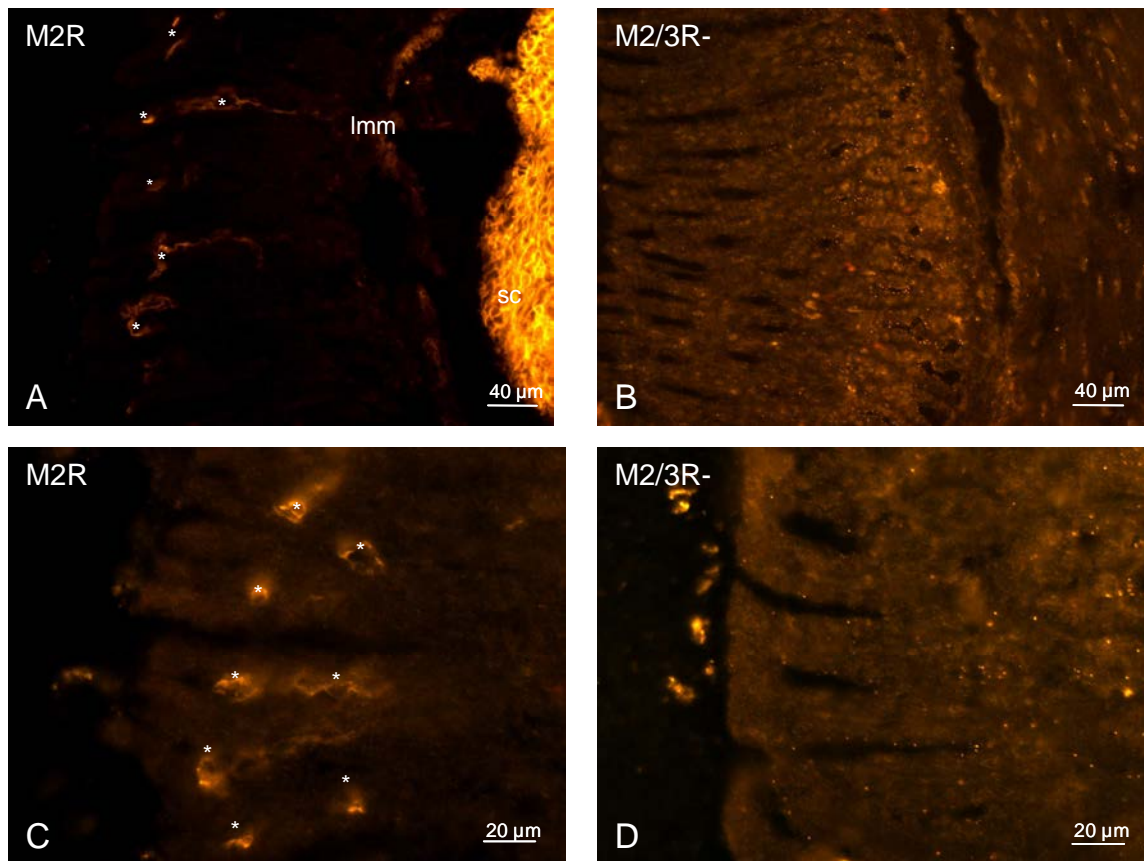


Abbildung 20: Pylorus, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Bild A zeigt eine deutlich angefärbte zirkuläre Muskulatur (sc), im geringem Maße ist auch die Lamina muscularis mucosae (Imm) markiert. Eine deutliche Immunreaktion ist auch in subepithelialen Zellen zu erkennen (Sternchen).

Das Bild B zeigt eine entsprechende Pylorusregion aus einem M2R/M3R-gendefizienten Tier. Hier sind weder die zirkulären Muskelzellen, noch die Lamina muscularis mucosae oder Zellen im Epithelbereich mit dem M2R-Antikörper markiert.

Die Bilder C und D zeigen Vergrößerungen aus der Mukosa einer Wildtypmaus und einer M2R/M3R KO-Maus.

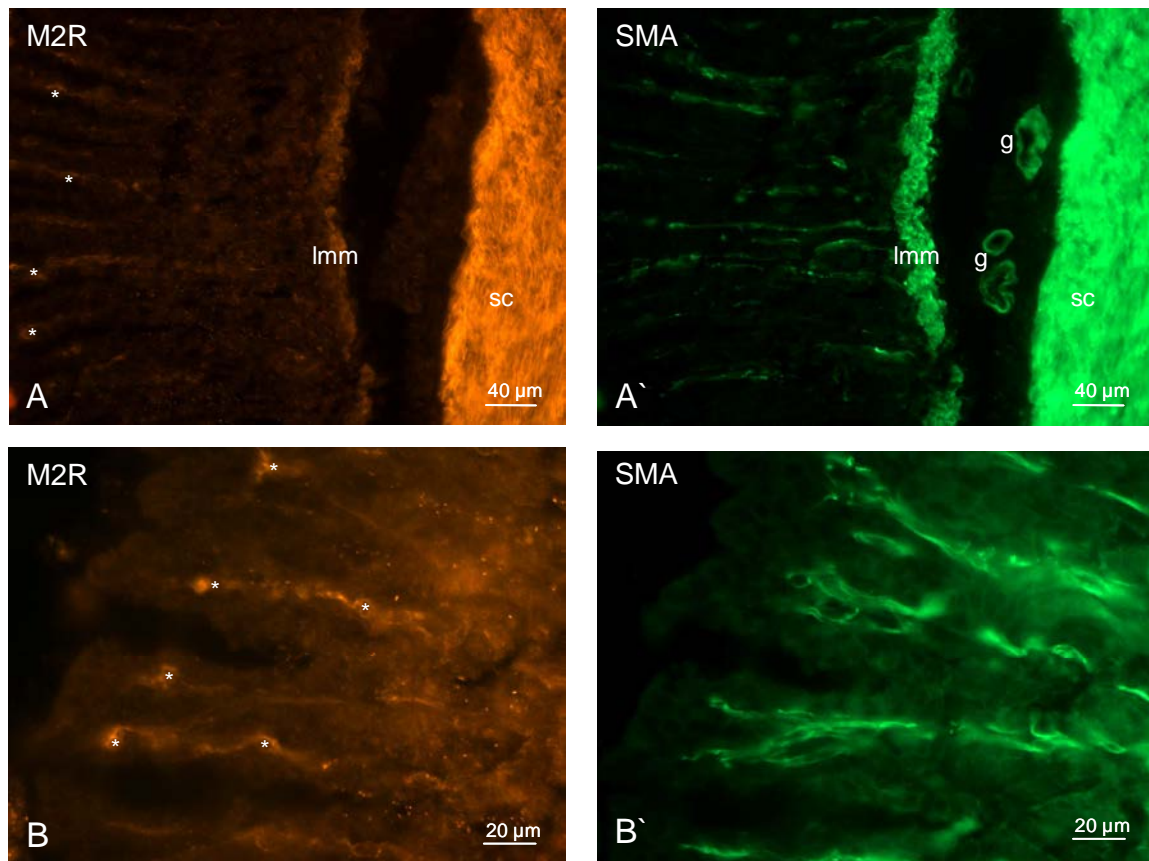


Abbildung 21: Pars pylorica, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Während Zellen in der Tunica muscularis (hier nur zirkuläre Anteile, sc) und der Lamina muscularis mucosae (Imm) doppelt markiert sind, zeigt die Gefäßmuskulatur (g) keine Markierung mit dem M2R-Antikörper (Bilder A, A'). Darüber hinaus sind Zellen in der Tunica mucosa immunreaktiv (Sternchen). In den Vergrößerungsbildern B und B' erkennt man, dass dies unterschiedliche Zellen sind. M2R-angefärbte Zellen (Sternchen) sind nur im subepithelialen Bereich zu finden, während glatte Muskelzellen die gesamte Tunica mucosa durchziehen.

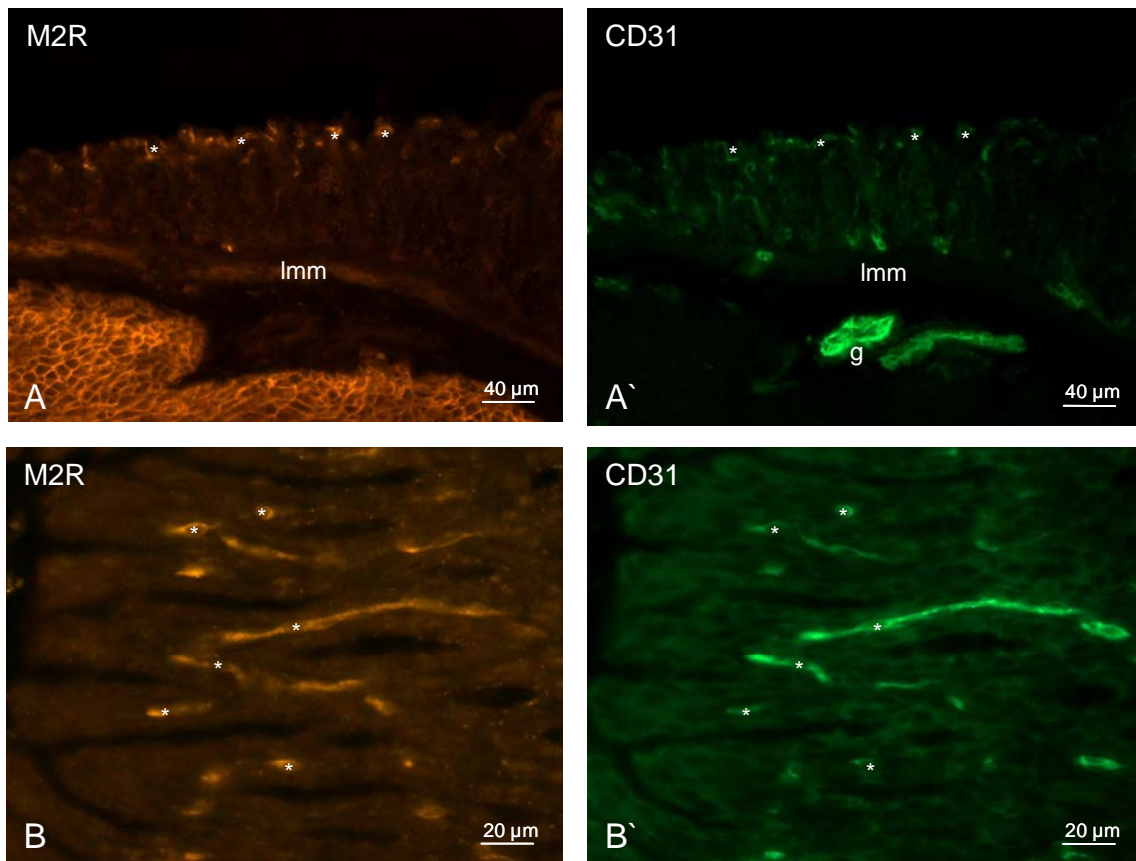


Abbildung 22: Pars pylorica, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

In beiden Bilderpaaren sind identische Zellen direkt unterhalb des Oberflächenepithels sowohl mit dem M2R-Antikörper als auch mit dem CD31-Antikörper angefärbt (Sternchen). Die Bilder B und B' sind eine Vergrößerung aus diesem Tunica mucosa-Bereich. Unterschiede sind im Stratum circulare (sc) der Tunica muscularis und in der Lamina muscularis mucosae (Imm) zu sehen. Diese sind nur durch den M2R-Antikörper angefärbt. In der Tela submucosa ist hingegen die Gefäßmuskulatur (g) mit dem M2R-Antikörper unmarkiert, während dort Endothelzellen durch den PECAM-1-Antikörper markiert werden (Bilder A und A').

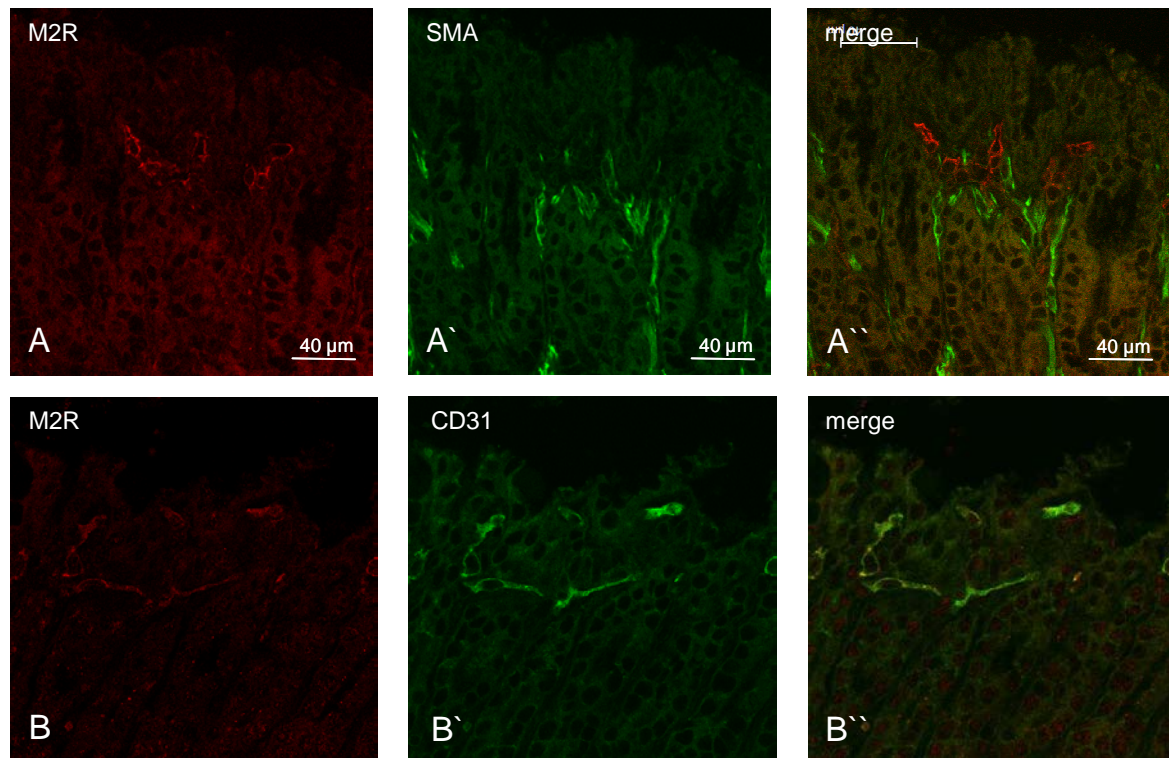


Abbildung 23: Pars pylorica, lumennaher Mukosabereich, CLSM

Die A-Serie wurde mit dem M2R-Antikörper (rot) und α SMA-Antikörper (grün) inkubiert. Man erkennt M2R-markierte Zellen im luminalen Mucosadrittel, während glatte Muskelzellen in den tieferen Lagen zu finden sind. Doppelt angefärbte Zellen sind nicht zu sehen.

In Serie B wurden der M2R-Antikörper (rot) und der CD31-Antikörper (grün) verwendet. Im überlagerten Bild erkennt man, dass beide Antikörper identische Zellen in der Tunica mucosa anfärben (gelbe Färbung).

3.2.4-3.2.6 Duodenum, Jejunum, Ileum

Im Duodenum, Jejunum und Ileum zeigte die Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper eine deutliche Immunreaktion im Bereich der Tunica muscularis und in den Zottenspitzen bei der Wildtypmaus, nicht jedoch im M2R-gendefizienten Tier (Abbildungen 24, 27, 32). Unspezifisch, da ebenfalls im Knockouttier markiert, banden das Mesothel (Abbildung 32) und Zellen der Glandulae (Abbildung 24 und 27) den Antikörper. Die Doppelimmunfluoreszenz mit dem M2R- und dem α SMA-Antikörper zeigte, dass alle glatten Muskelzellen der Tunica muscularis den M2R exprimierten (Abbildung 25, 28 und 33). Im Duodenum und Jejunum fehlte eine Lamina muscularis mucosae (Abbildung 28). Erst im Ileum existierte wieder eine dünn-schichtige, nur durch den α SMA-Antikörper markierte Lamina muscularis mucosae (Abbildung 33). Allen Dünndarmabschnitten gemeinsam waren wiederum die in den apikalen Zottenbereich gelegenen deutlich für den M2R immunreaktiven Zellen (Abbildung 25, 29, 34). Alle Aufnahmen aus diesem lumennahen Bereich zeigten keine Co-Lokalisation mit α SMA-Immunreaktivität, es handelte sich also nicht um glatte Muskelzellen. Auch glatte Muskelzellen der Muskelpumpe und der Gefäßmuskulatur exprimierten keinen M2R. Die unterschiedliche Lage von M2R- und α SMA-markierten Zellen in den Villi zeigt stellvertretend für alle Dünndarmabschnitte die CLSM Bildserie des Ileums (Abbildung 37). Die Doppelimmunfluoreszenz mit M2R- und PECAM-1-Antikörpern zeigten für genau diese Zellen eine Doppelmarkierung (Abbildung 26, 31, 36). Während die immunreaktiven Endothelzellen die gesamte Zotte durchliefen, lagen die M2R-positiven Zellen fast ausschließlich im zum Lumen gerichteten Anteil (Abbildung 30, 31). In der Tela submucosa gelegene Endothelzellen wurden im Gegensatz dazu nicht mit dem M2R-Antikörper markiert (Abbildung 35). Die für diese Antikörper mittels CLSM aufgenommene Bildserie verdeutlicht die Co-Lokalisation (Abbildung 37).

3.2.4 Duodenum

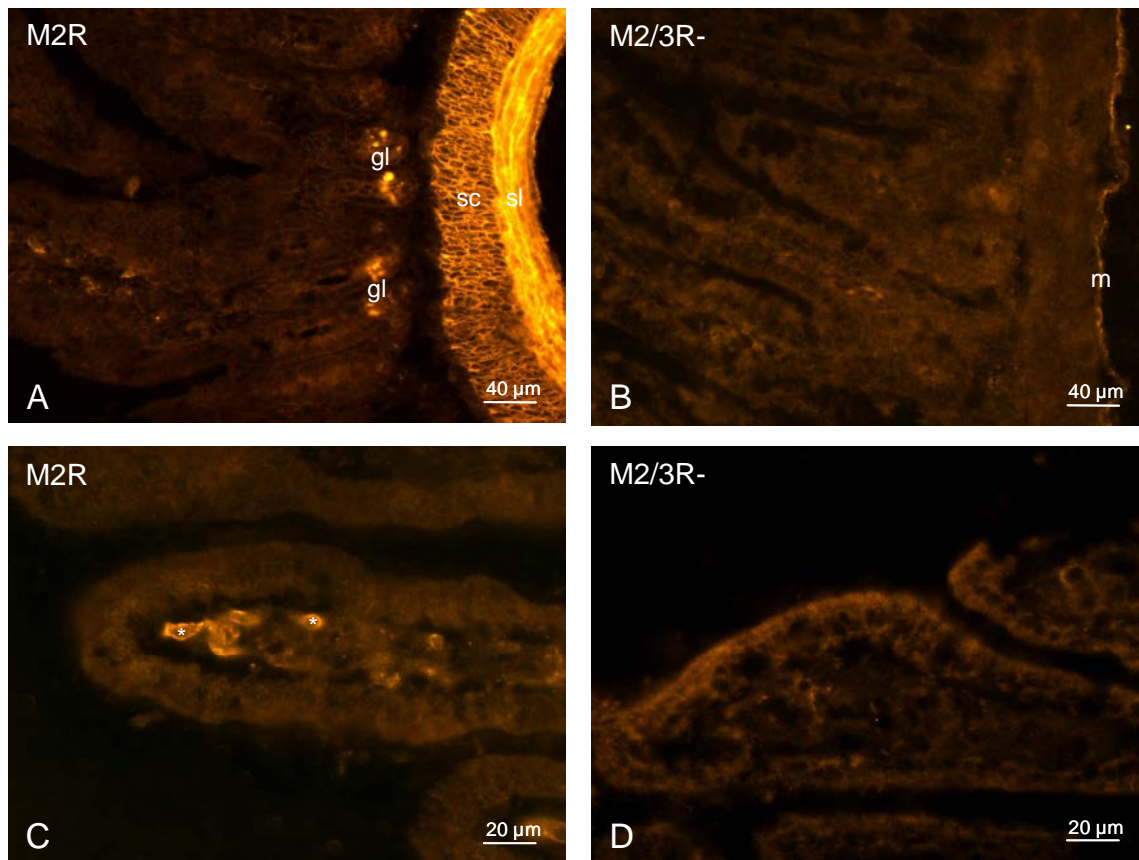


Abbildung 24: Duodenum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Die Tunica muscularis und Zellen in den Zottenspitzen sind deutlich immunreaktiv für den M2R (Bild A). Die Bilder C und D zeigen Vergrößerungen aus dem Zottenbereich. Hier liegen M2R angefärbte Zellen fast ausschließlich im apikalen Zottenbereich (Sternchen in Bild C). Drüsen (gl, Bild A) und Mesothel (m, Bild B) werden unspezifisch markiert. Eine Lamina muscularis mucosae ist in den Duodenumabschnitten nicht vorhanden.

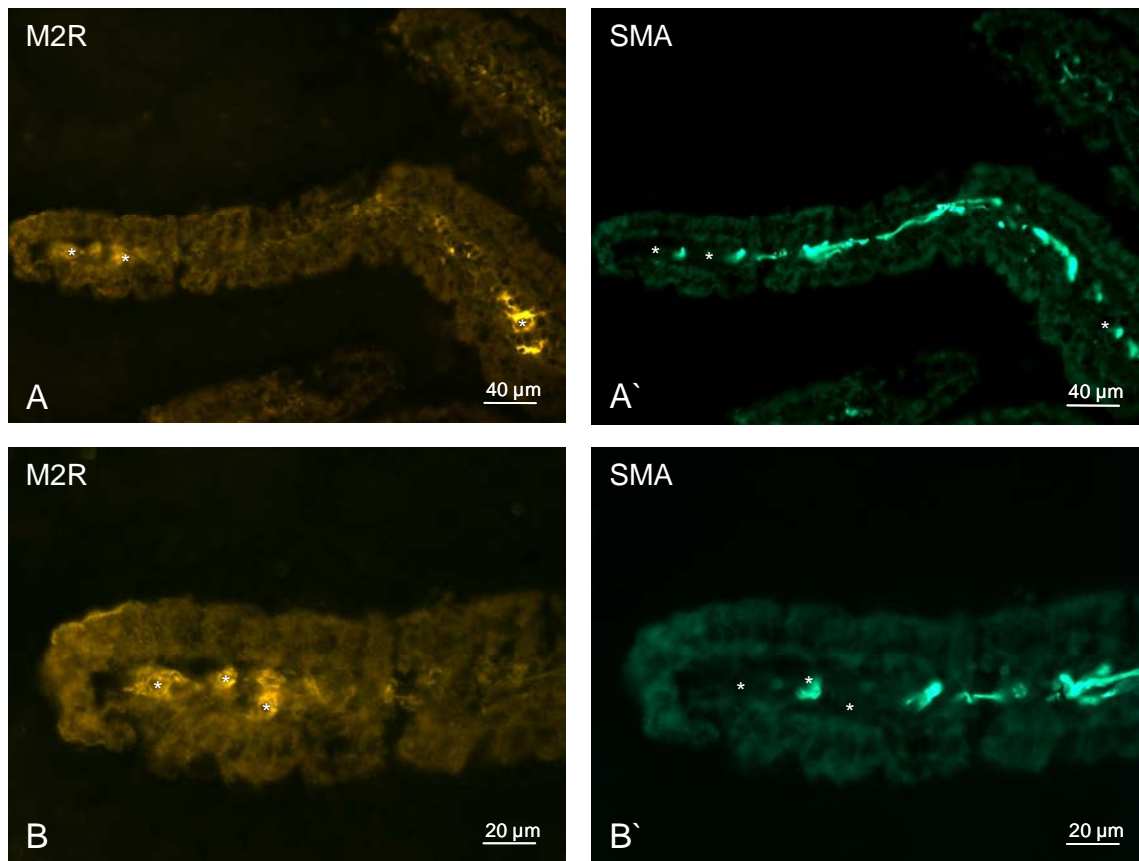


Abbildung 25: Duodenum, apikaler Zottenbereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Es zeigen sich M2R-markierte Zellen (Sternchen) insbesondere im apikalen Bereich der Zotten (Bilder A und B), während Zellen der Muskelpumpe (grün) diesen nicht erreichen. Sternchen kennzeichnen identische Zellen im jeweiligen Bildpaar.

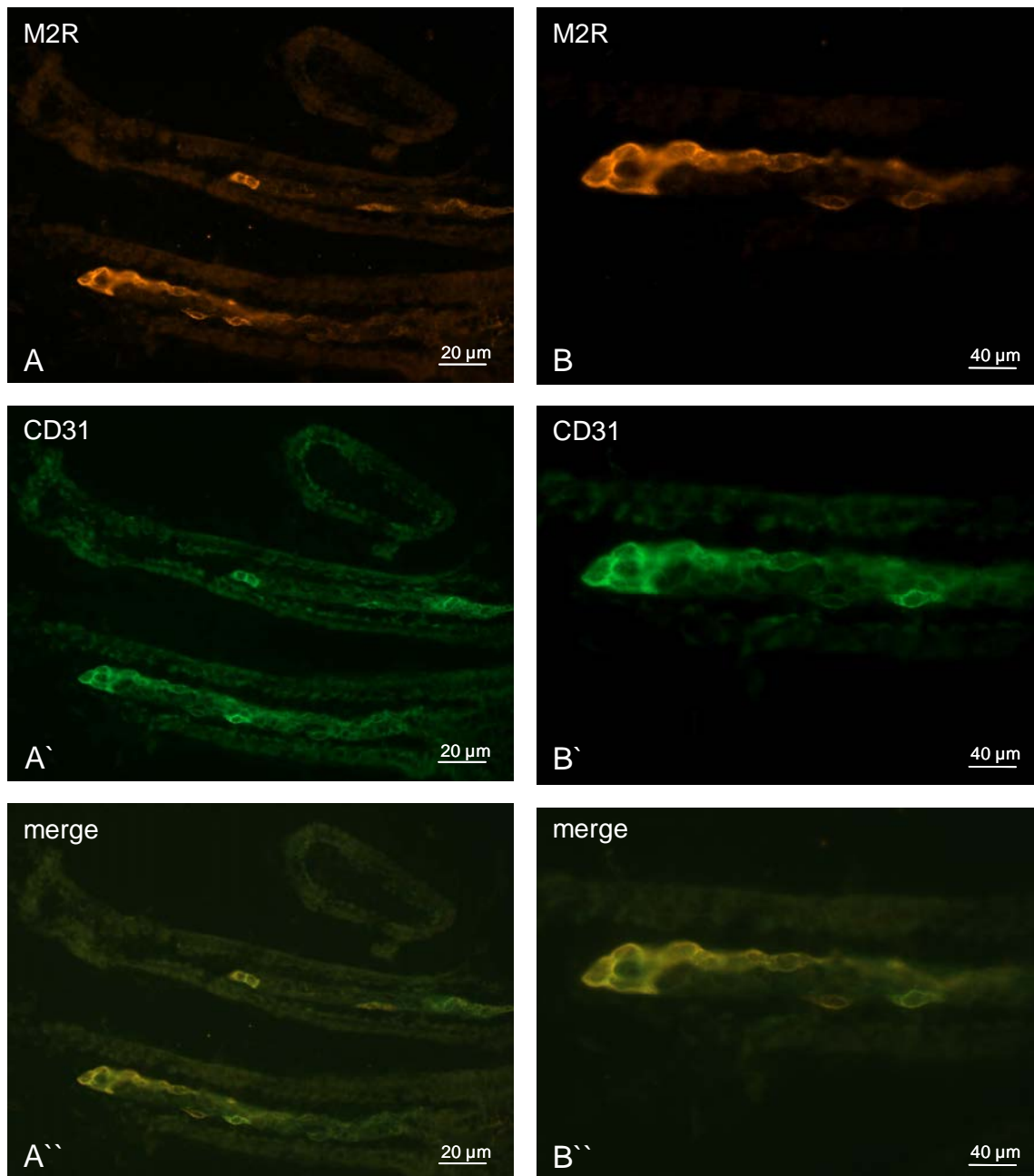


Abbildung 26: Duodenum, apikaler Zottenbereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

In Bildserie A findet sich eine intensive Anfärbung von M2R-positiven Zellen im apikalen Bereich der Zotten. Genau diese Zellen werden auch mit dem CD31-Antikörper markiert. Dies verdeutlicht Serie B, welche eine Vergrößerung eines Zottenabschnittes zeigt. Die gelbliche Markierung in den Bildern A'' und B'' zeigt die Doppelmarkierung an.

3.2.5 Jejunum

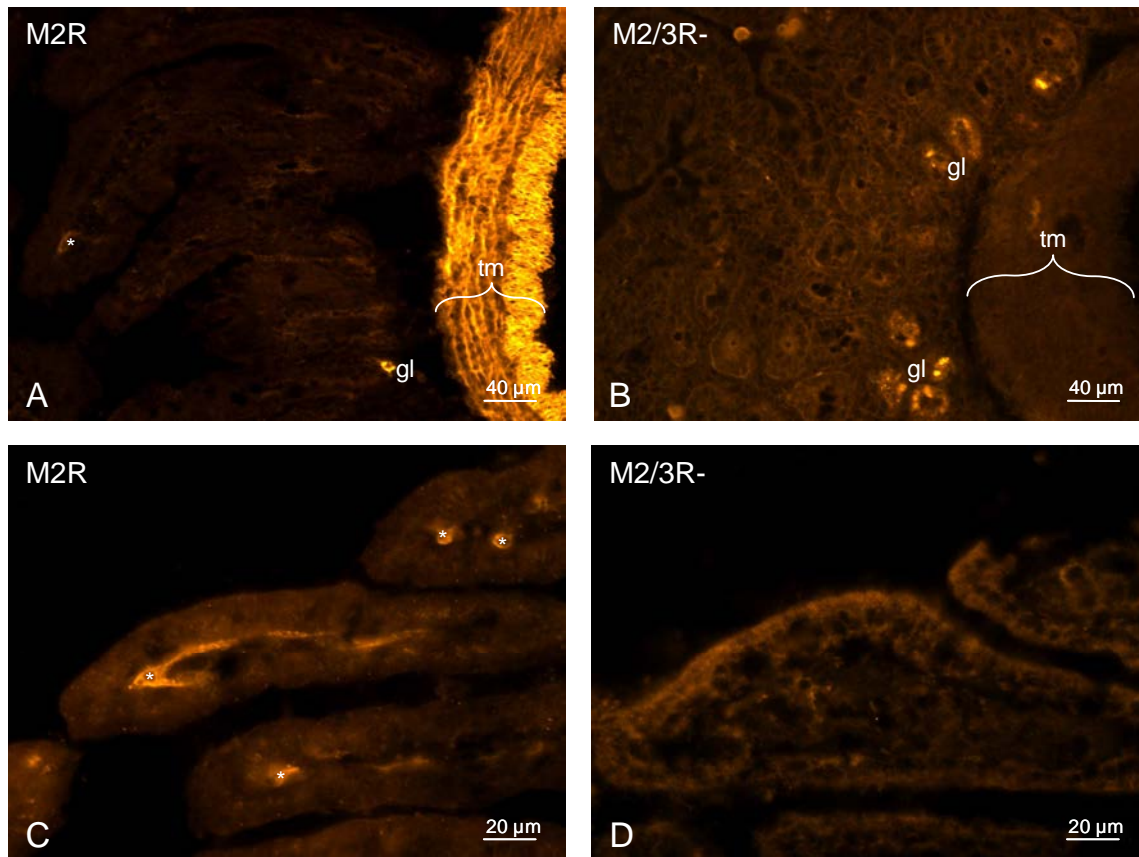


Abbildung 27: Jejunum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Deutliche Anfärbung der Tunica muscularis (tm) sowie von Zellen in den Zotten (Sternchen, Bilder A und C). Zellen der Glandulae (gl) sind auch im M2R-gendefizienten Tier angefärbt (Bild B). Im Jejunum ist keine Lamina muscularis mucosae vorhanden. Bild D zeigt einen Zottenabschnitt aus einer M2R-gendefizienten Maus.

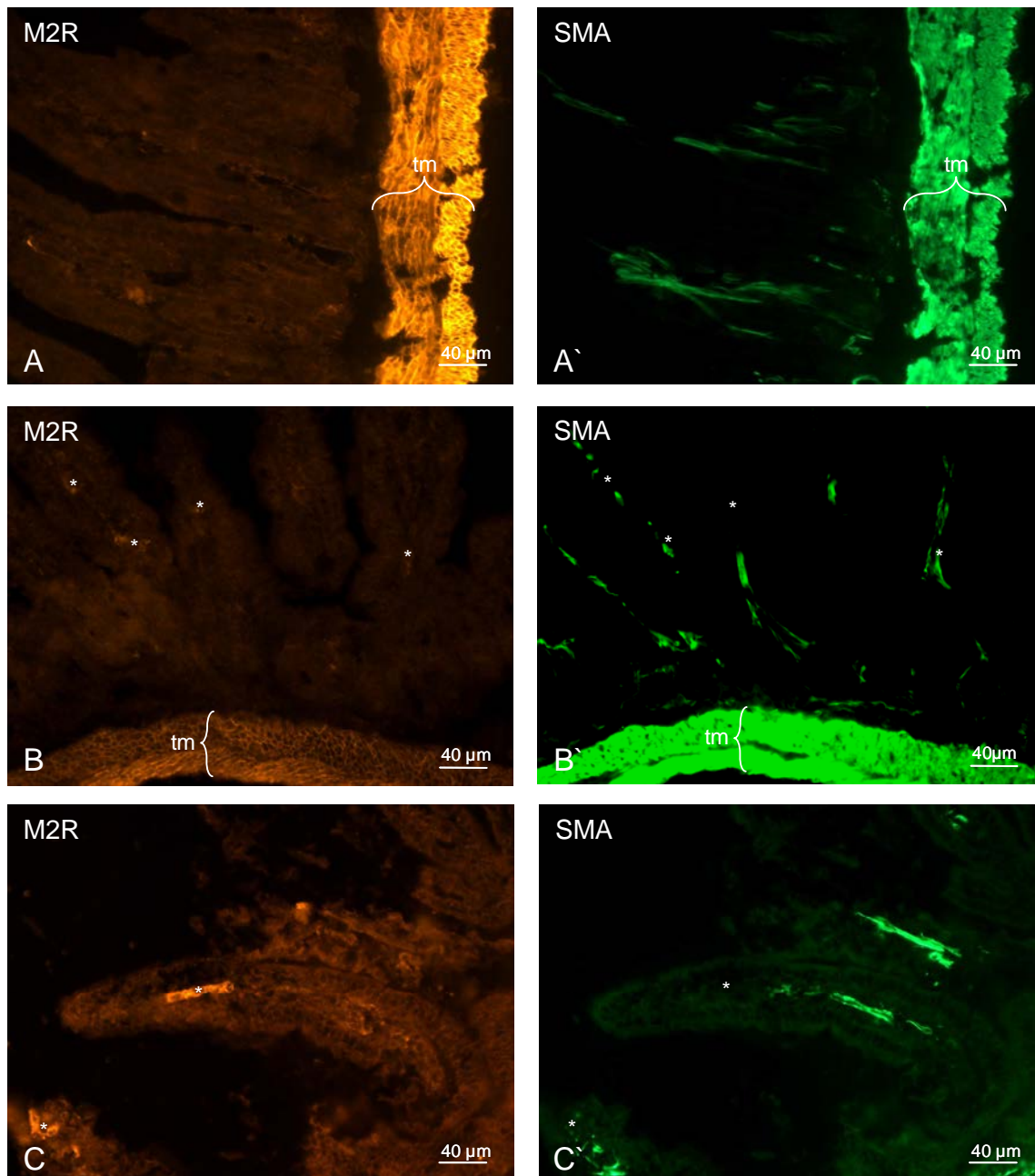


Abbildung 28: Jejunum, Doppelimmunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen M2R und α SMA

Anfärbung der Tunica muscularis (tm, Bildpaare A und B) sowie von Zellen in den Zotten. Die komplette Tunica muscularis ist auch für den α SMA immunreaktiv (Bilderpaare A und B). Während der M2R nur im luminalen Bereich der Zotten zu finden ist (Sternchen), sind glatte Muskelzellen der Zottenpumpe in dieser Region nicht vorhanden (Bilderpaar C).

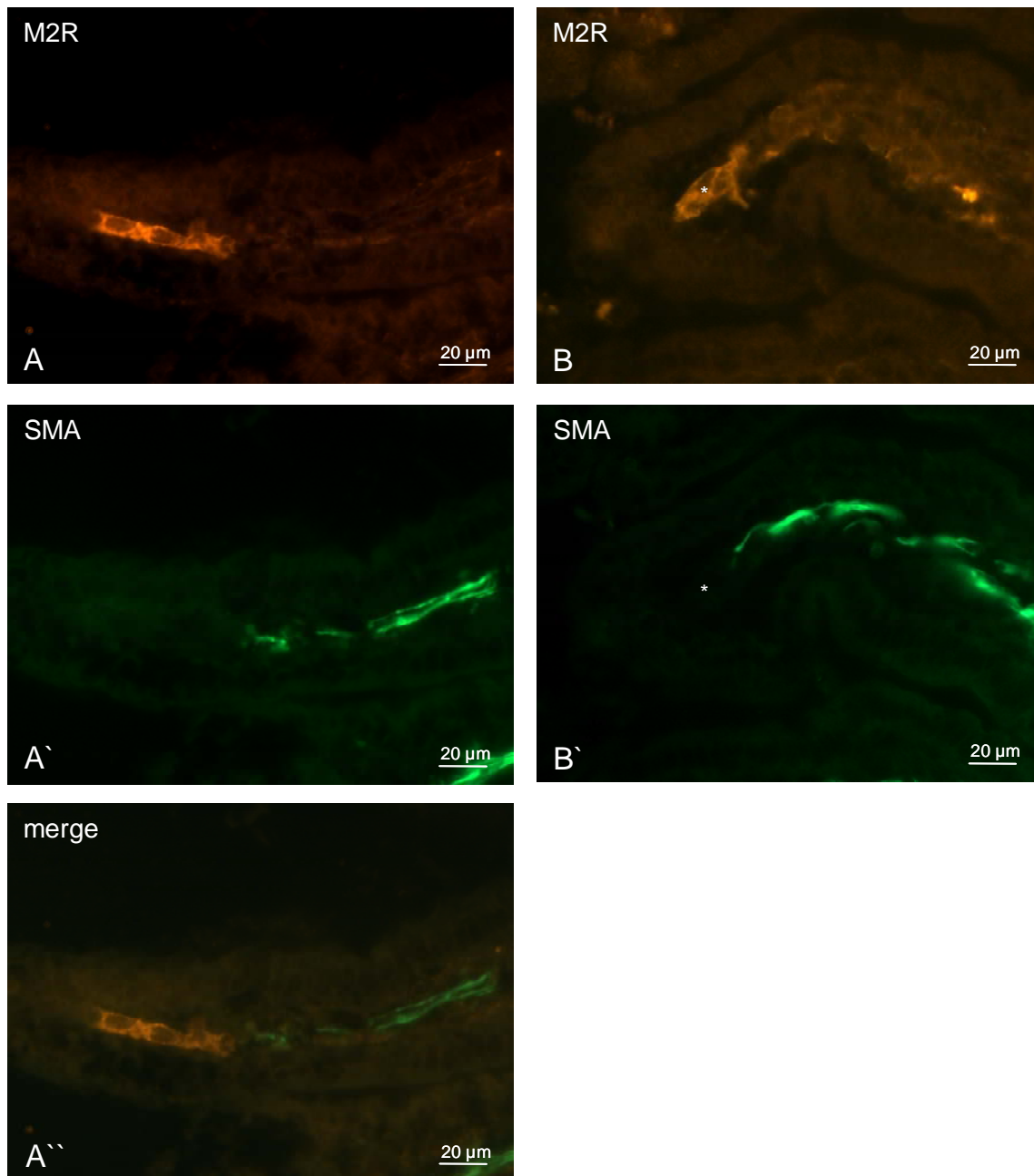


Abbildung 29: Jejunum, lumennaher Zottenbereich, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

In diesen Vergrößerungen verdeutlicht sich die unterschiedliche Lage der M2R- und der α SMA-positiven Zellen. M2R-positive Zellen sind hauptsächlich direkt subepithelial oder im lumennahen Bereich vorhanden (Bilder A und B), während glatte Muskelzellen in den meisten Fällen den apikalen Bereich nicht erreichen oder getrennt von M2R-markierten Zellen liegen (Bilder A', A'' und B').

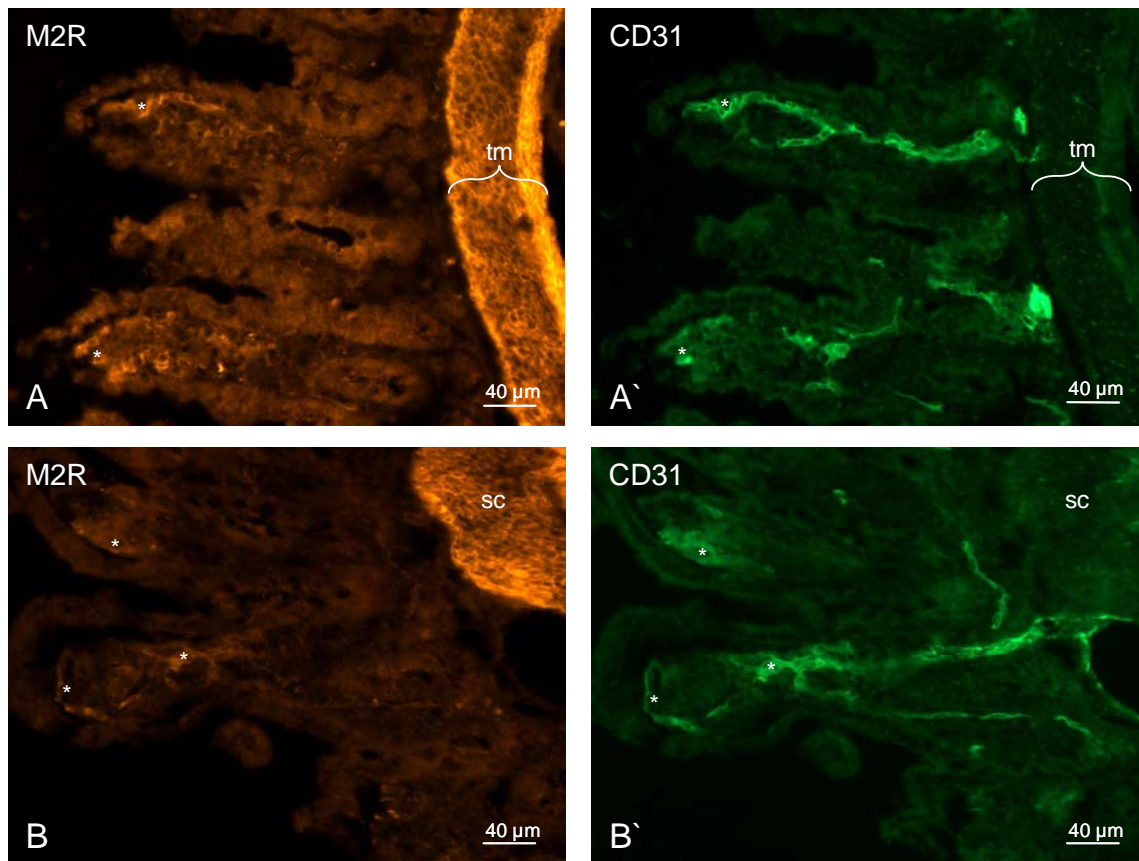


Abbildung 30: Jejunum, Doppelimmunfluoreszenz gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Die Bilder A und B zeigen eine mit dem M2R-Antikörper deutlich angefärbte Tunica muscularis (tm, Bild B nur Stratum circulare (sc) abgebildet) sowie gefärbte Zellen im subepithelialen Zottenbereich (Sternchen). Die mit CD31-Antikörper angefärbten Endothelzellen durchlaufen die kompletten Villi (Bilder A' und B') und sind nur im adluminalen Bereich ebenfalls mit dem M2R-Antikörper markiert.

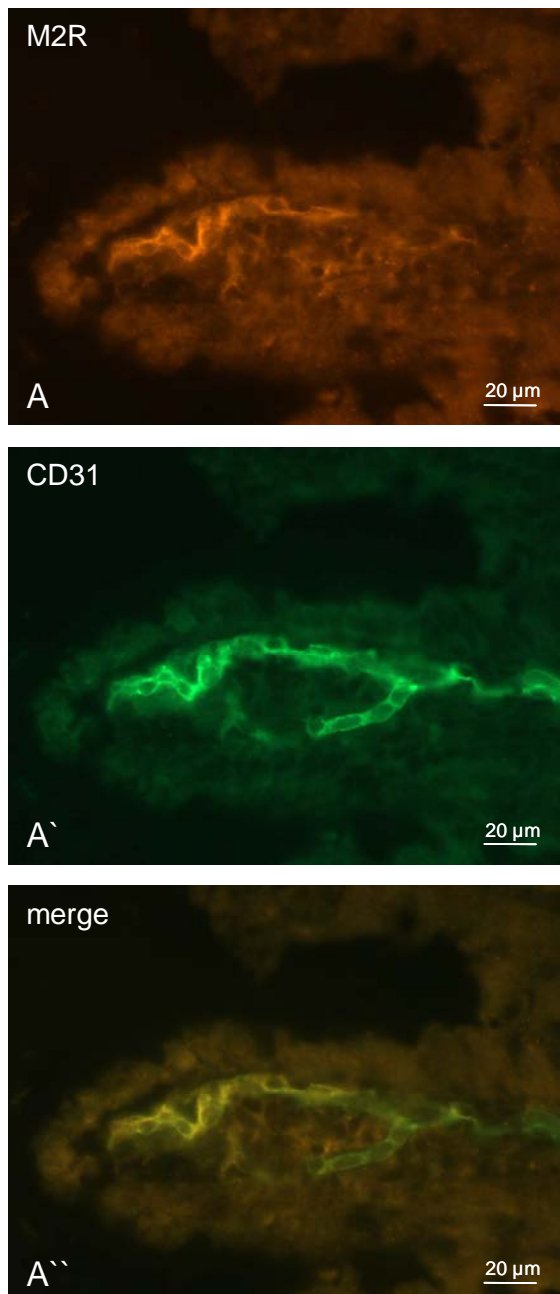


Abbildung 31: Jejunum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Die Bildserie zeigt eine Vergrößerung aus dem Zottenbereich. Die M2R sind nur im adluminalen Bereich zu erkennen (Bild A), während die Endothelzellen die Villi komplett durchlaufen (Bild A'). Dies verdeutlicht das Überlagerungsbild A''.

3.2.6 Ileum

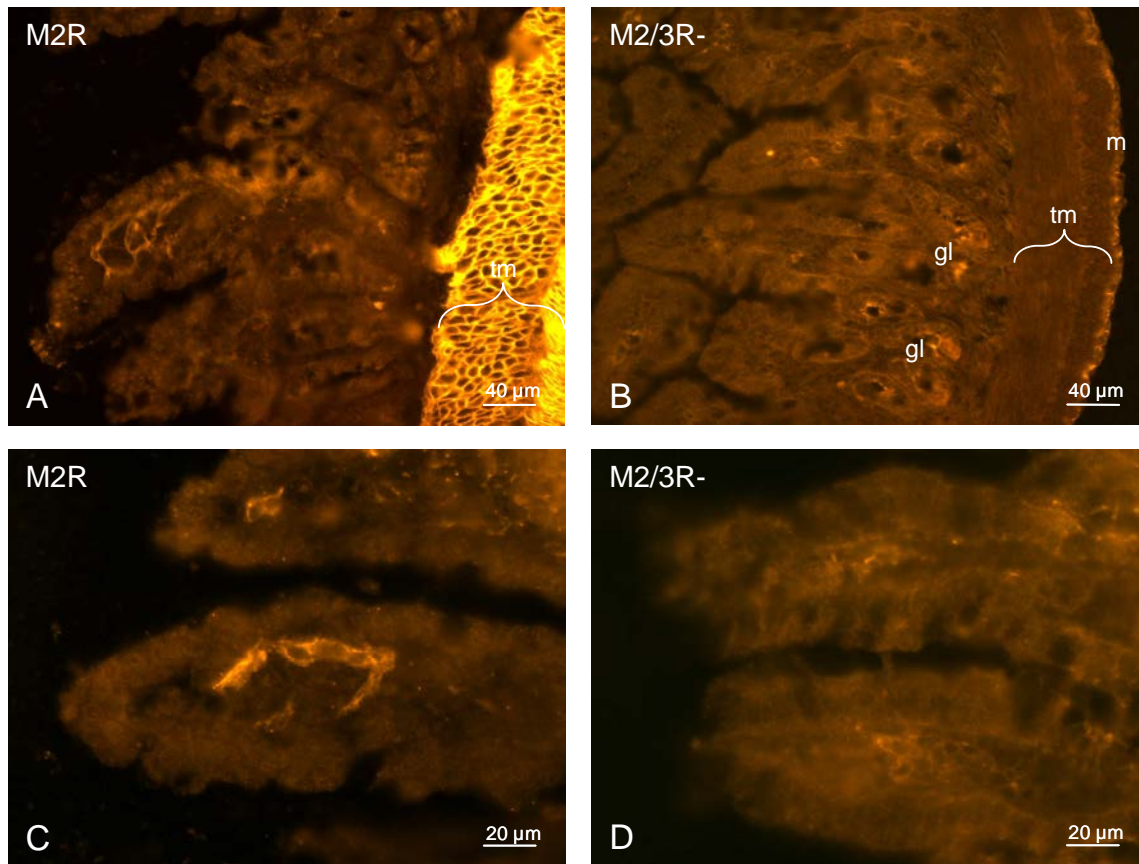


Abbildung 32: Ileum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Auch im Ileum ist die Tunica muscularis (tm) deutlich für den M2R immunreaktiv (Bild A). In den Zotten sind Zellen, wie auch im übrigen Dünndarm, besonders im adluminalen Bereich angefärbt (Bild C). In einem M2R-gendefizienten Tier sind in gleichen Ileum-Abschnitten weder die Tunica muscularis (tm, Bild B) noch Zellen in den Zotten angefärbt (Bild D). Einzig das Mesothel (m) und Zellen der Glandulae (gl) erscheinen unspezifisch markiert (Bild B).

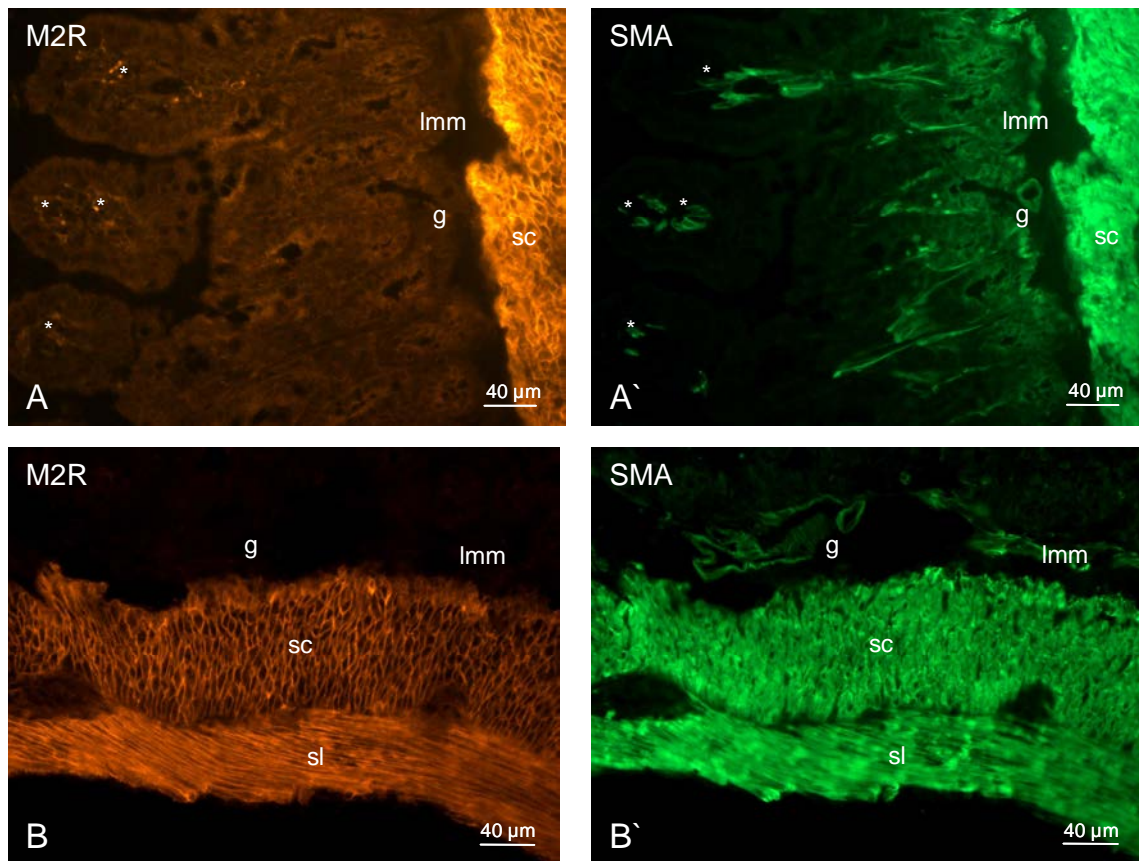


Abbildung 33: Ileum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Eine deutliche Anfärbung der Tunica muscularis mit Stratum circulare (sc) und longitudinale (sl) durch beide Antikörper ist in den Bilderpaaren A und B zuerkennen. Eine dünnsschichtige Lamina muscularis mucosae (Imm), in der Tela submucosa liegende Gefäßmuskulatur und von der Lamina muscularis mucosae ausgehende glatte Muskelzellen, welche in die Zotten ziehen, sind nur durch den α SMA-Antikörper markiert (Bilder A' und B'). Mit Sternchen sind in Bild A M2R-markierte Zellen in den Zotten gekennzeichnet. Die identischen Zellen in Bild A' sind nicht durch den α SMA-Antikörper markiert.

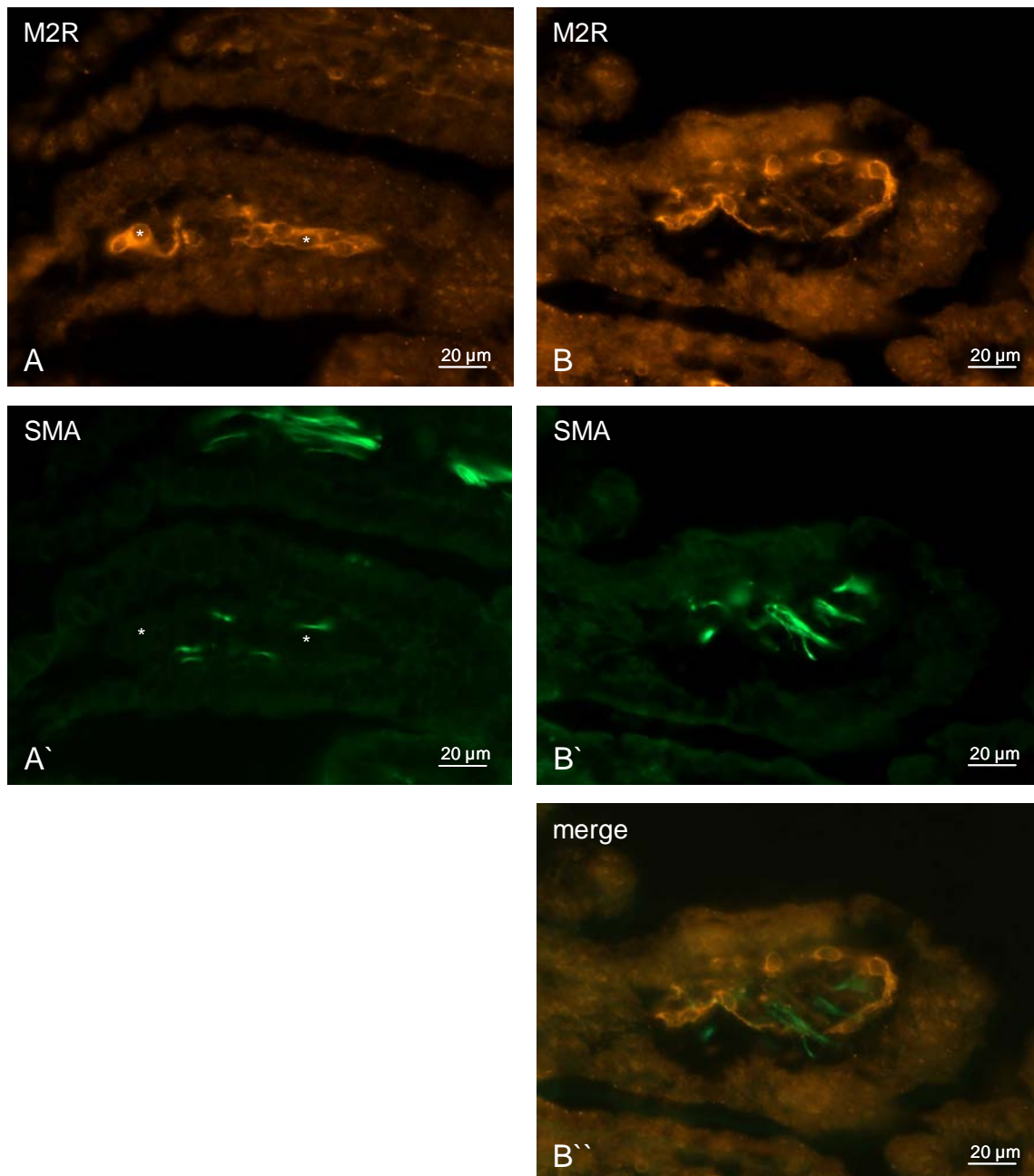


Abbildung 34: Ileum, Vergrößerung der adluminalen Zottenabschnitte, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Es ist keine Übereinstimmung von M2R- (Sternchen in Bildserie A, A') und α SMA-markierten Zellen zu erkennen.

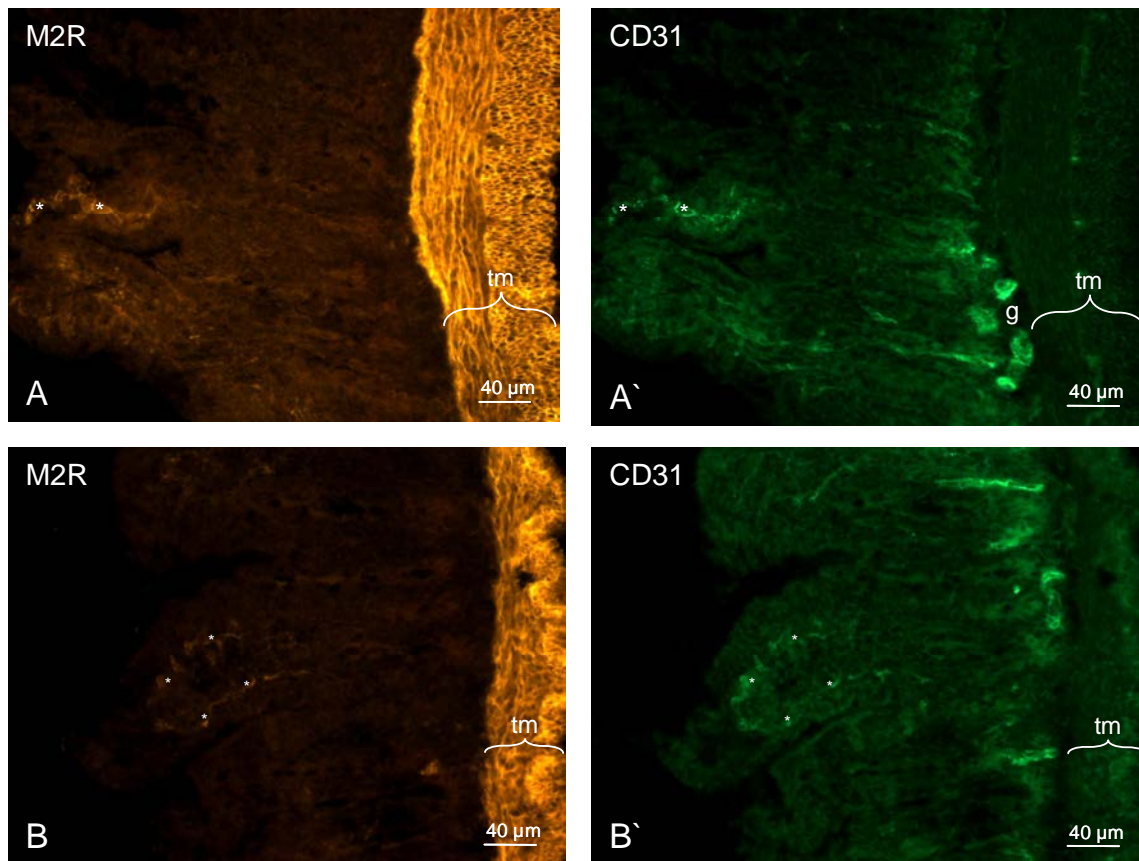


Abbildung 35: Ileum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Die Tunica muscularis (tm) ist immunreaktiv für den M2R-Antikörper. In der Zottenspitze sind ebenfalls markierte Zellen zu finden (Sternchen in den Bildern A und B). Diese sind identisch mit den PECAM-1-positiven Endothelzellen (Sternchen in den Bildern A' und B'). In der Tela submucosa liegende Gefäßendothelien (g) werden nur von dem PECAM-1 Antikörper markiert (Bild A').

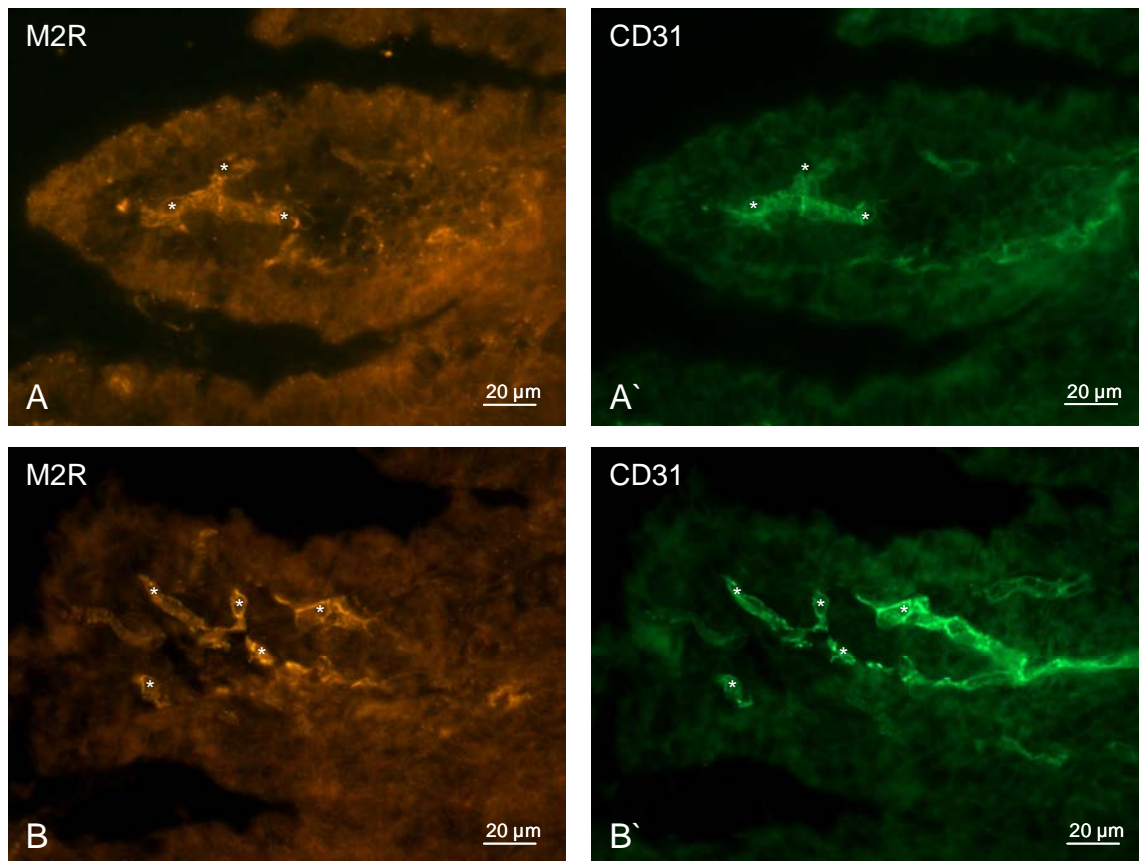


Abbildung 36: Ileum, Vergrößerung aus dem luminalen Zottenbereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

In unmittelbarer Nähe zu dem Epithel liegen doppelt markierte Zellen (Sternchen). Die markierten Endothelzellen durchlaufen die gesamte Zotte, M2R-positive Zellen sind fast ausschließlich im zum Lumen gerichteten Anteil gelegen.

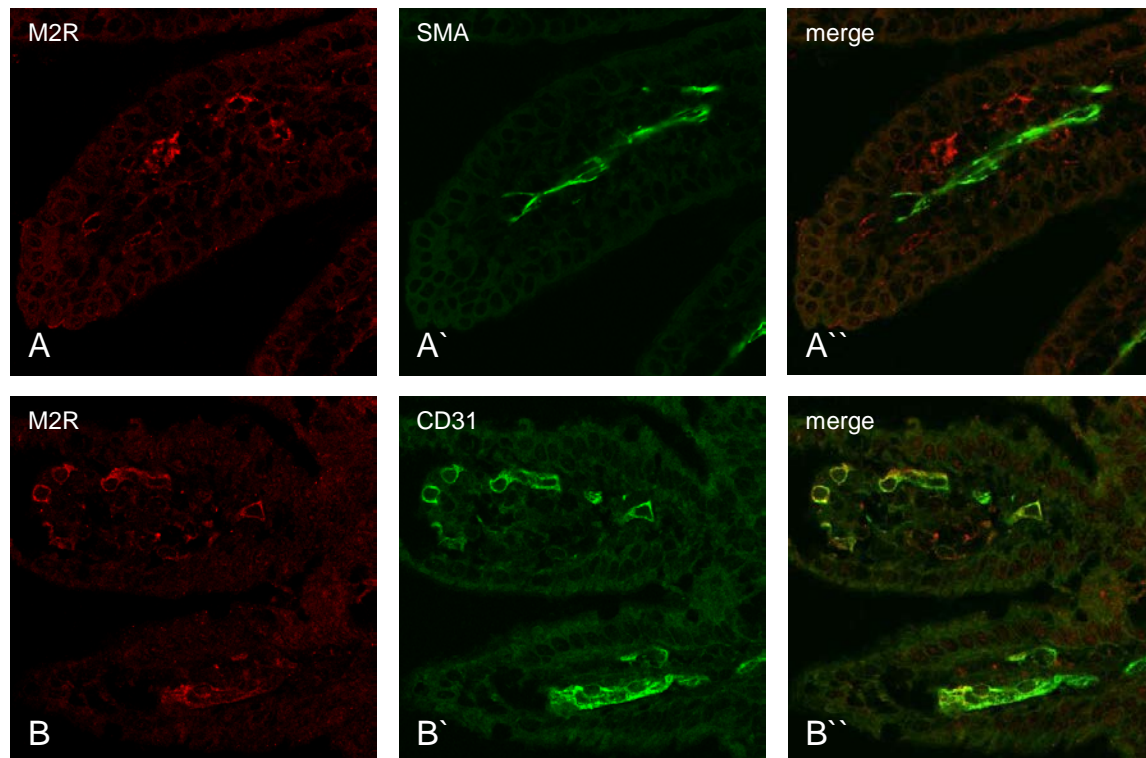


Abbildung 37: Ileum, Zottenspitzen, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA (Serie A), sowie mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31) (Serie B), CLSM-Aufnahme

Bildserie A zeigt die unterschiedliche Lage von M2R und α SMA markierten Zellen in den Villi. Bildserie B verdeutlicht die Co-Lokalisation des M2R mit PECAM-1 (gelb).

3.2.7 Caecum

Die Vergleichsaufnahmen zwischen einer M2R KO- und einer Wildtypmaus zeigten M2R-exprimierende Zellen in der Tunica muscularis und im lumennahen Bereich der Lamina propria mucosae (Abbildung 38). Im Gewebe des gendefizienten Tiers wurden keine Zellen markiert. Die Doppelimmunfluoreszenz mit dem M2R- und dem α SMA-Antikörper zeigte nur eine Doppelmarkierung der Tunica muscularis (Abbildung 39), während die Lamina muscularis mucosae, glatte Gefäßmuskulatur und Myozyten der Muskelpumpe nur für den α SMA-Antikörper positiv waren (Abbildung 40). Die Bilder mit dem PECAM-1-Antikörper, insbesondere die Vergrößerungsaufnahmen aus der epithelnahen Schicht, zeigten eine Markierung der M2R-immunreaktiven Zellen, welche unter dem Oberflächenepithel in der Lamina propria lagen (Abbildung 41 und 42).

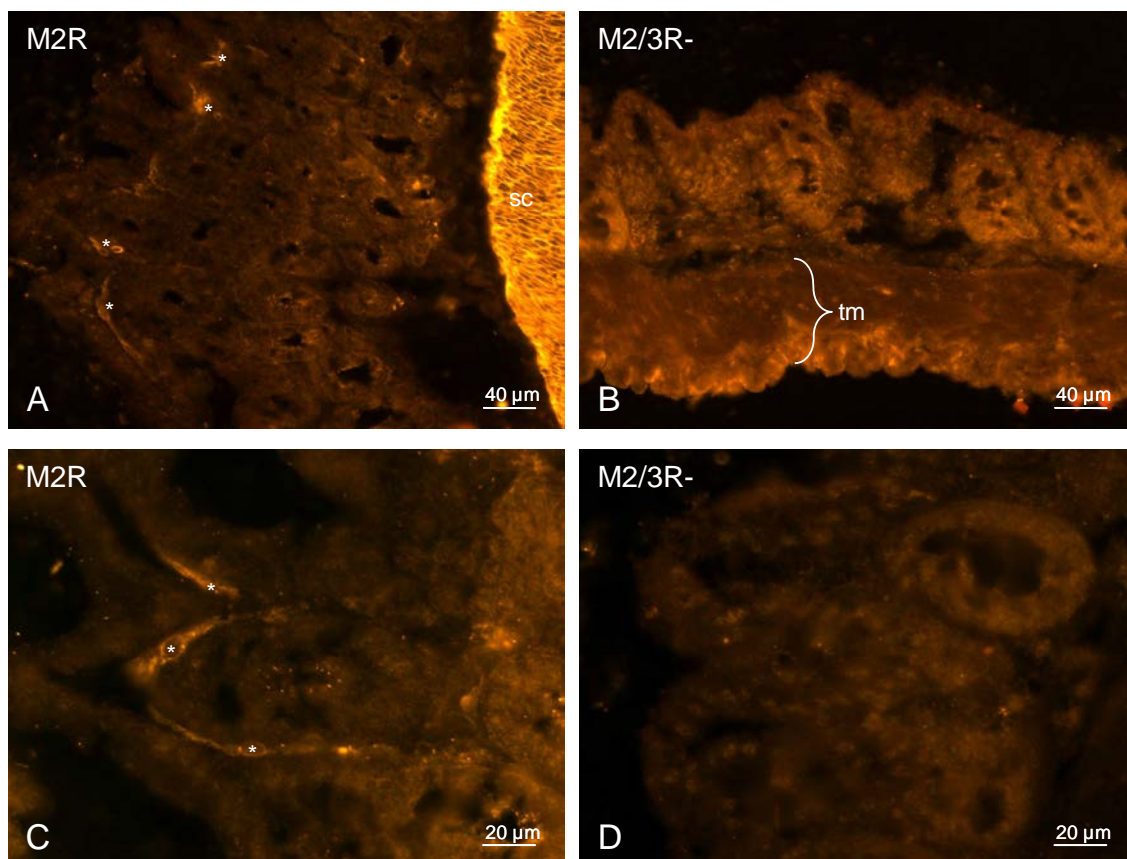


Abbildung 38: Caecum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Vergleichsaufnahmen zwischen einer M2R KO- und einer Wildtyp-Maus. M2R-exprimierende Zellen liegen in der Tunica muscularis (Bild A, nur Stratum circulare (sc) angeschnitten) und im lumennahen Bereich der Lamina propria mucosae (Sternchen

in den Bildern A und C). Im Gewebe des gendefizienten Tieres sind keine Zellen markiert (Bilder B und D).

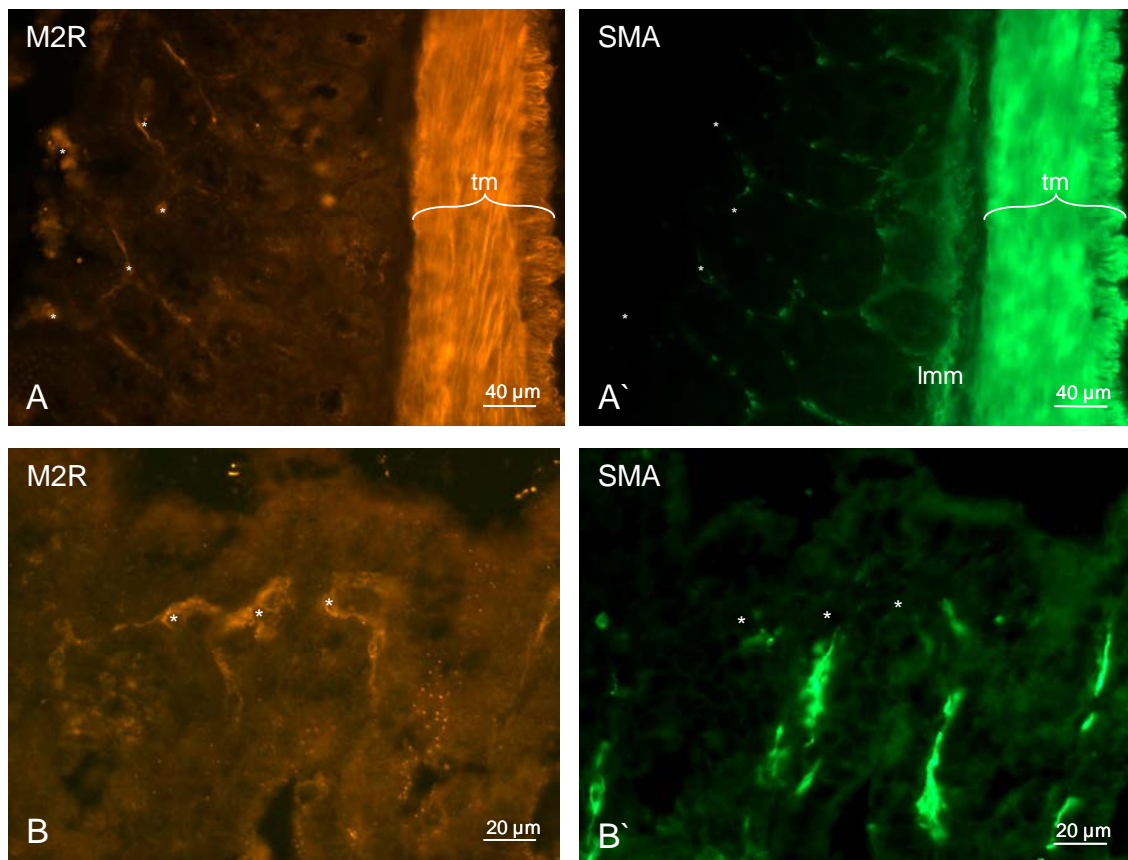


Abbildung 39: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Die Tunica muscularis ist doppelt markiert (tm, Bilderpaar A, A'). Die Lamina muscularis mucosae (Imm) ist nur für α SMA positiv (Bild A'). Vergrößerungen aus dem Epithelbereich zeigen, dass M2R-positive Zellen keine Zellen der Muskelpumpe sind (Bilder B, B').

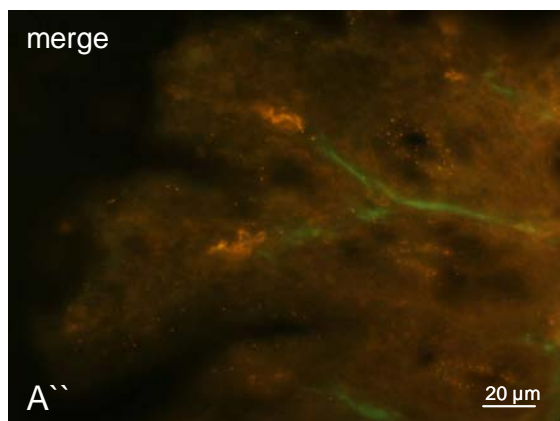
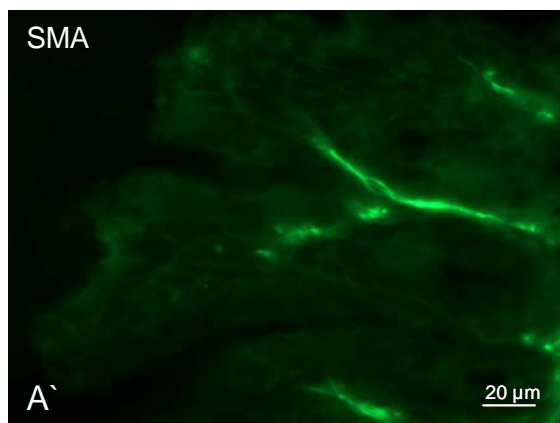
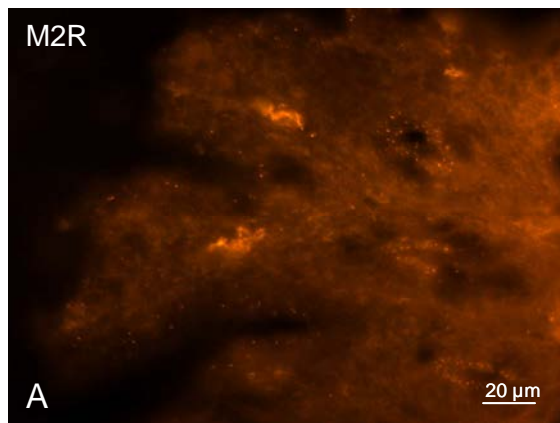


Abbildung 40: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Diese Serie zeigt einen lumennahen Epithelbereich. Wie im Überlagerungsbild A'' verdeutlicht, sind die M2R-markierten Zellen keine glatten Muskelzellen.

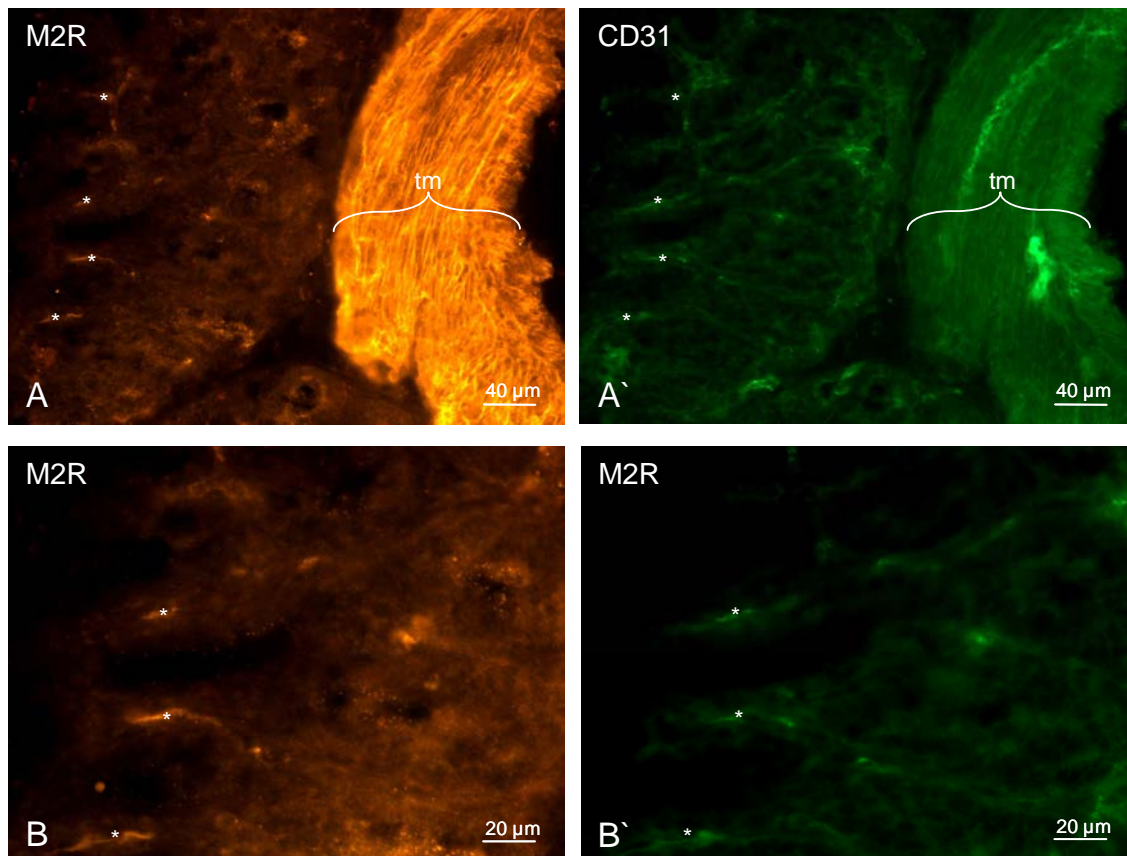


Abbildung 41: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Im Querschnitt zeigen sich M2R-markierte Zellen im Bereich der Tunica muscularis (tm) und der Lamina propria (Sternchen, Bildpaar A, A'). Markierte Endothelzellen kommen dagegen nur vereinzelt in der Tunica muscularis vor (Bild A'), erscheinen aber identisch mit den M2R-positiven Zellen in der Lamina propria (Sternchen in B und B').

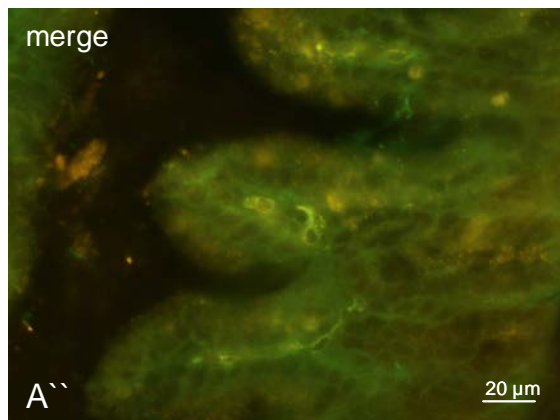
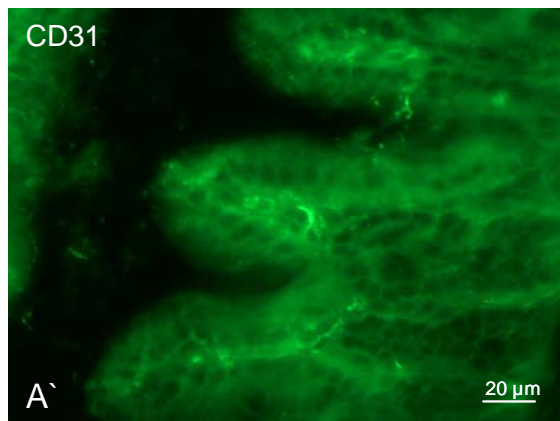
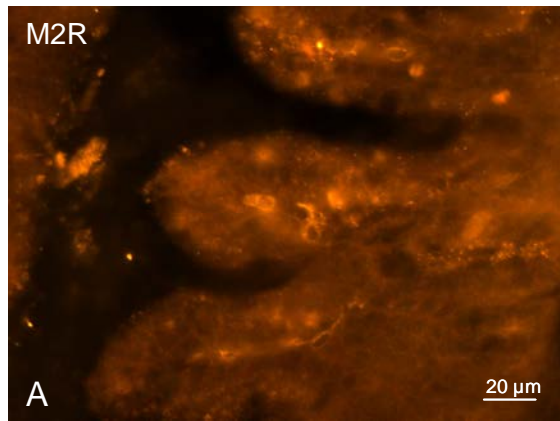


Abbildung 42: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Die Vergrößerung der lumennahen Schicht verdeutlicht als gelbliche Überlagerung eine Doppelmarkierung (A``).

3.2.8 Colon descendens

Im Colon descendens zeigte sich bei Testung der Antikörperspezifität eine deutliche Immunreaktion in der Tunica muscularis und der Lamina muscularis mucosae sowie in den bereits oben beschriebenen subepithelialen Zellen. Bei der gendefizienten Maus erschienen Becherzellen unspezifisch markiert. Auffällig für diesen Darmabschnitt war eine wieder deutlich ausgeprägte Lamina muscularis mucosae (Abbildung 43). Diese wurde, ebenso wie die Tunica muscularis, doppelt mit dem α SMA- und dem M2R-Antikörper markiert (Abbildung 44). Glatte Muskelzellen, welche ausgehend von der Lamina muscularis mucosae bis in den subepithelialen Bereich zogen, waren dies nicht (Abbildung 45). Vergrößerungsbilder des Epithelbereiches verdeutlichen, dass vereinzelte Zellen direkt unterhalb des Oberflächenpithels den M2R exprimierten, während glatte Muskelzellen diesen Bereich nicht erreichten (Abbildung 45).

Diese lumennahen Zellen waren Endothelzellen, wie die Doppelimmunfluoreszenz mit dem M2R- und dem PECAM-1-Antikörper verdeutlicht (Abbildung 46). Weitere doppelt positive Zellen bestanden nicht. Markierte Endothelzellen in der Tela submucosa zeigten keine Immunreaktion mit dem M2R-Antikörper (Abbildung 46). Die CLSM-Bilderserien, welche jeweils für einen lumennahen Mukosabereich angefertigt wurden, zeigten den gleichen Befund wie die oberen Abschnitte des Magen-Darm-Kanals: eine Co-Lokalisation der M2R- und der PECAM-1-Immunreaktivität (Abbildung 48) sowie keine Doppelmarkierung mit dem α SMA-Antikörper (Abbildung 47).

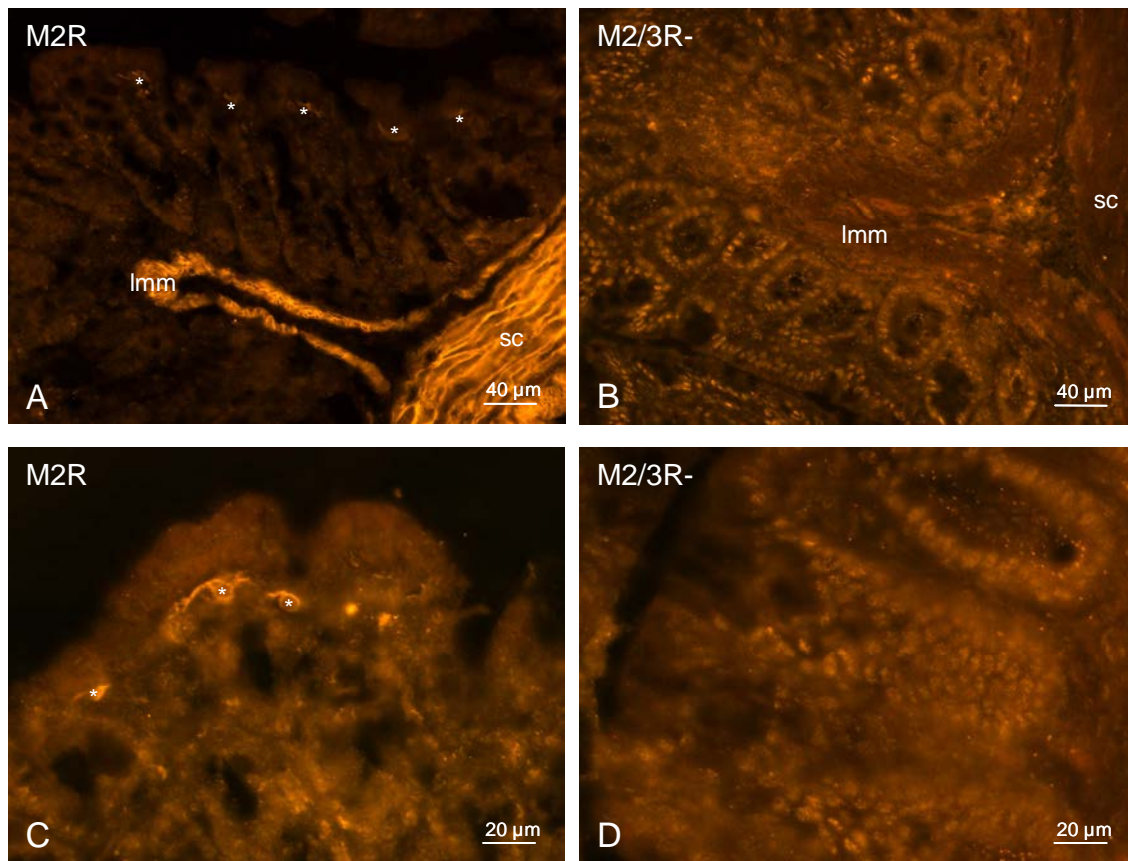


Abbildung 43: Colon descendens, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper

Es sind deutliche Anfärbungen im Stratum circulare (sc) der Tunica muscularis, der Lamina muscularis mucosae (Imm) sowie von Zellen im subepithelialen Bereich (Sternchen, Bilder A und C) in den Schnitten der Wildtyp-Maus zu erkennen. Bei der gendefizienten Maus erscheinen Becherzellen, welche sich um die Kryptenlichtungen gruppieren, unspezifisch markiert (Bilder B und D).

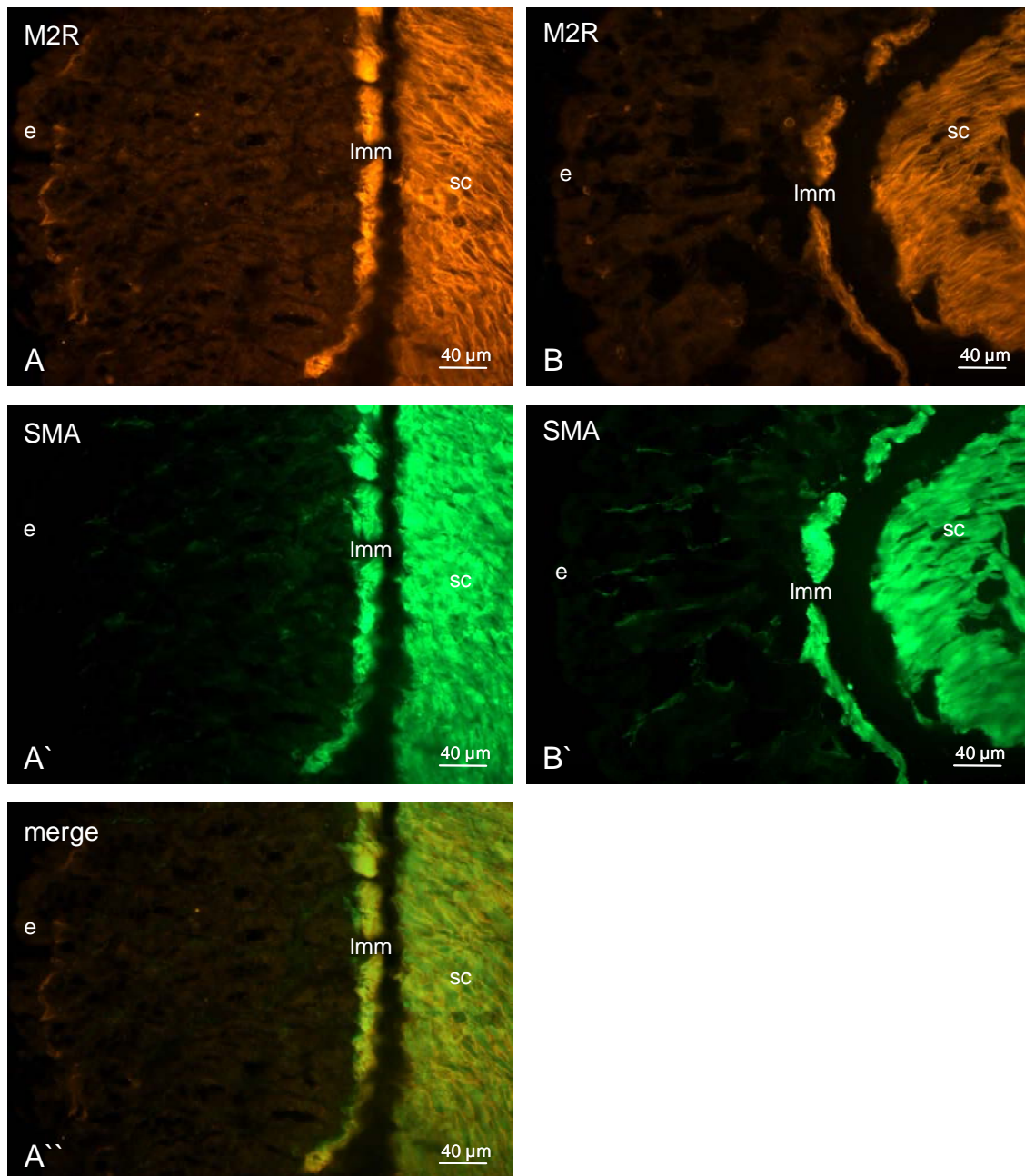


Abbildung 44: Colon, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Beide Schnitte durch die Schleimhaut zeigen ein doppelt angefärbtes Stratum circulare (sc) der Tunica muscularis und Lamina muscularis mucosae (Imm). M2R-immunreaktive Zellen finden sich in der Lamina propria mucosae in unmittelbarer Nähe des hochprismatischen Epithels (e) (Bilder A und B). Glatte Muskelzellen ziehen, ausgehend von der Lamina muscularis mucosae, bis in den subepithelialen Bereich (Bilder A' und B'). Das Bild A'' ist ein Überlagerungsbild, indem doppelt angefärbte Zellen gelblich erscheinen.

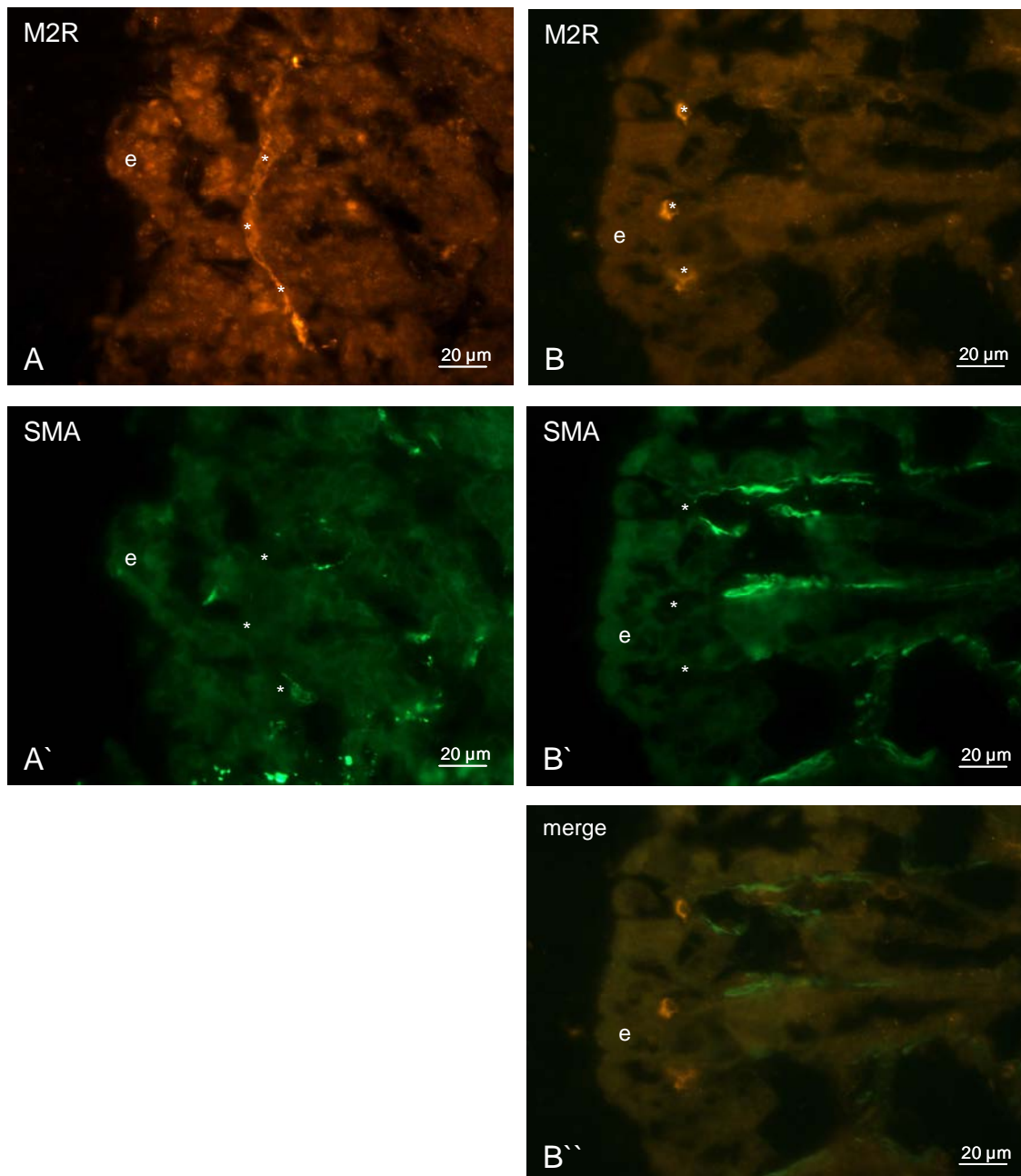


Abbildung 45: Colon, Vergrößerung des Oberflächenepithelbereiches, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

Während M2R-exprimierende Zellen (Sternchen in den Bildern A und B) vereinzelt direkt unter dem Oberflächenepithel (e) vorkommen, erreichen glatte Muskelzellen diesen Bereich nicht (Bilder A', und B'). Dies verdeutlicht das Überlagerungsbild B''.

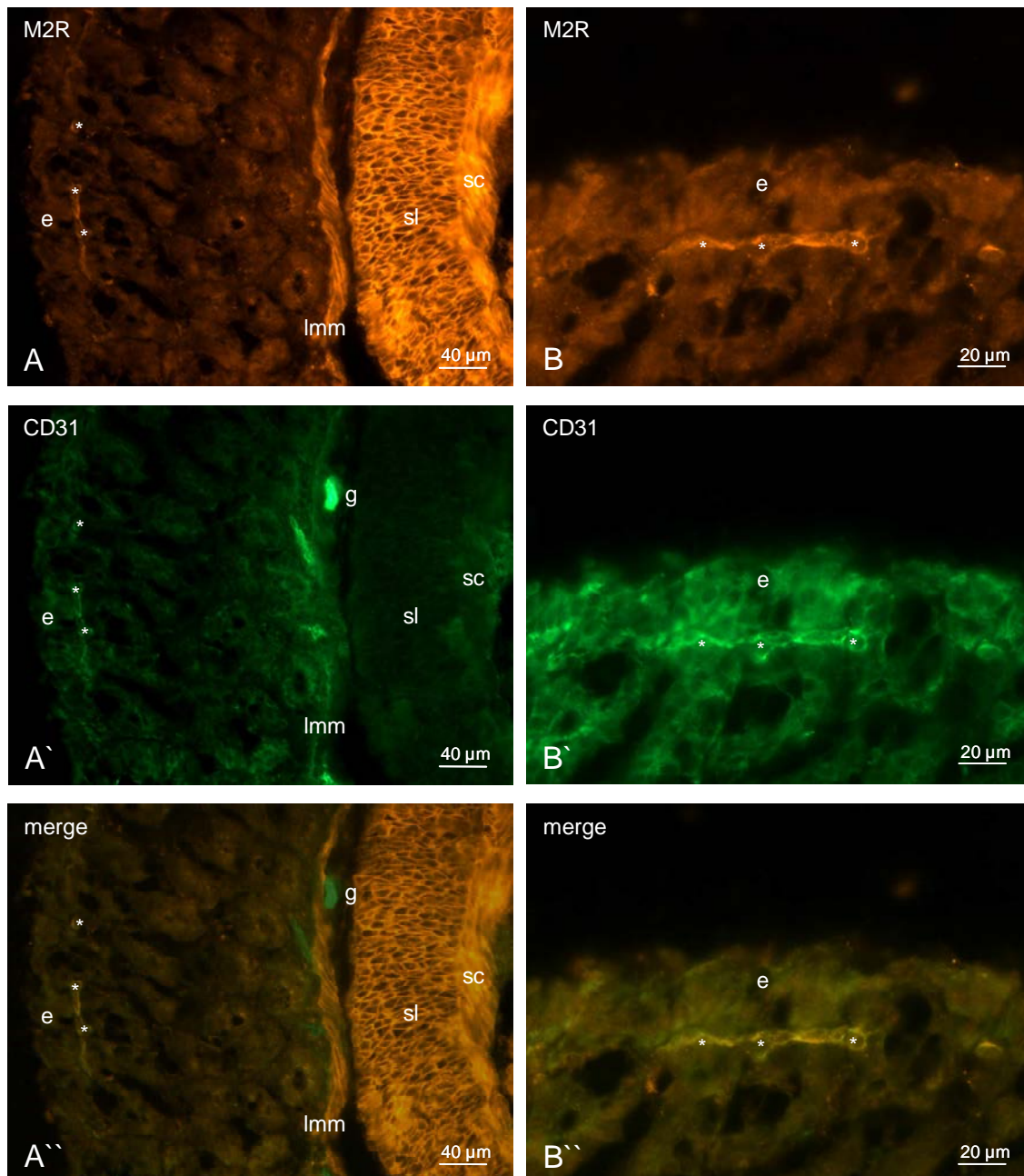


Abbildung 46: Colon, Doppelimmunfluoreszenz mit M2R- und PECAM-1 (CD31)-Antikörpern

Das Bild A zeigt eine deutliche Markierung mit dem M2R-Antikörper in der Tunica muscularis (Stratum circulare (sc) und Stratum longitudinale (sl)), der Lamina muscularis mucosae (Imm) und von Zellen im Epithelbereich (e). Bild A'' verdeutlicht, dass Endothelzellen (g) in der Submucosa keinen M2R exprimieren, während Endothelzellen in der lumennahen Mukosa (Sternchen) dies tun (Bildserie B).

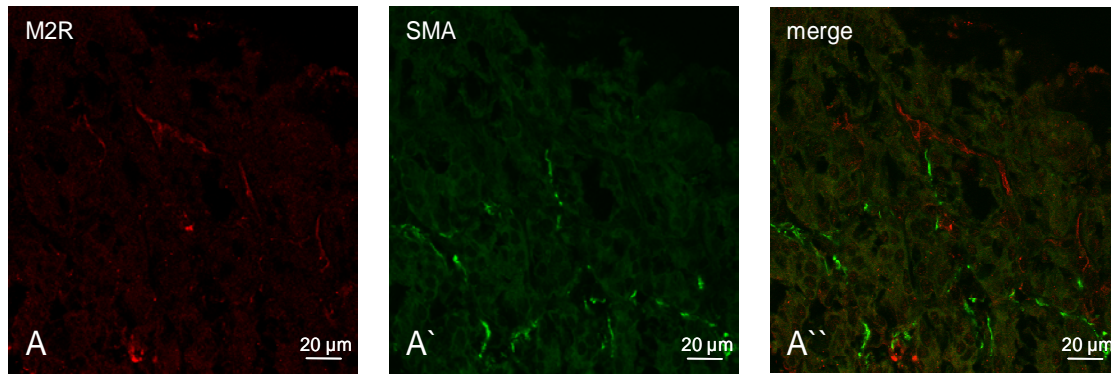


Abbildung 47: Colon, lumennaher Mukosabereich, CLSM, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA

In den CLSM-Bildern verdeutlicht sich, dass die M2R-positiven Zellen unterhalb des Epithels nicht α SMA-immunreaktiv sind (merge). M2R-positive Zellen kommen innerhalb der Tunica mucosae nur unmittelbar unterhalb des Oberflächenepithels vor. Die glatten Muskelzellen durchlaufen die Tunica mucosa fast komplett, erreichen aber nicht den epithelnahen Bereich.

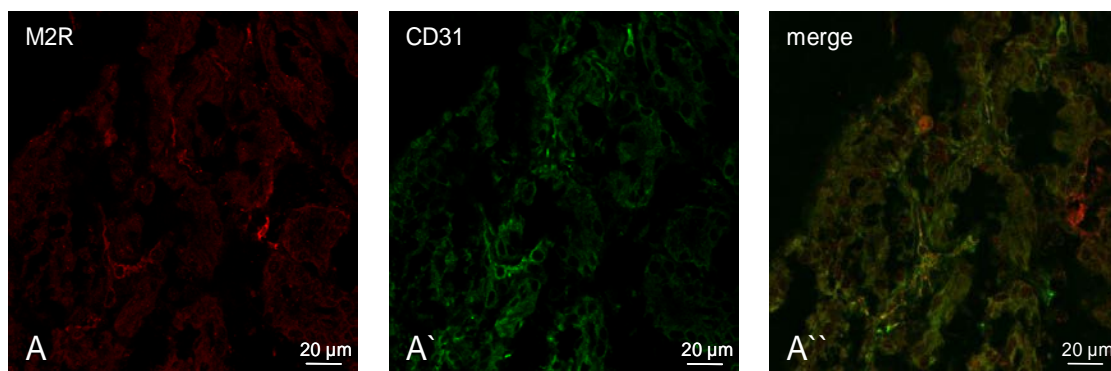


Abbildung 48: Colon, lumennaher Mukosabereich, CLSM, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)

Auch im Colon zeigt sich die schon in den oberen Abschnitten des Magen-Darm-Kanals beschriebene Co-Lokalisation von M2R und PECAM-1 (CD31).

4. Diskussion

Es existieren zahlreiche Veröffentlichungen zur Funktion und morphologischen Verteilung des M2R in den verschiedensten Spezies und Organabschnitten. Insbesondere die Funktion des M2R in der glatten Muskulatur des Verdauungstraktes der Maus, aber auch vom Herzen, der Atemwege und der Blase (Stengel et al. 2000, Ehlert et al. 2003, Takeuchi et al. 2006, Unno et al. 2006, Kitazawa et al. 2007) wurde besonders intensiv untersucht. Diese Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der M2R in den meisten Organen eine Kontraktion der glatten Muskelzellen vermittelt, welche ihn exprimieren. Es bestehen verschieden Ansichten über den Wirkmechanismus. Ehlert berichtete 2003 von zwei möglichen Mechanismen, zum einem durch eine starke Hemmung der Relaxation durch eine Verringerung des zytosolischen cAMP, zum anderen eine geringgradige direkte Verstärkung der durch den M3R hervorgerufenen Kontraktionen (Ehlert et al. 1999 und 2003). Die lange Zeit grundlegende Annahme, dass ein einzelner Rezeptor eine bestimmte Antwort vermittelt, ist mittlerweile verlassen worden, da durch neue Methoden zunehmend klar wurde, dass diese durch mehrere Rezeptorsubtypen reguliert werden. Dem M2R alleine wurde bisher nur eine geringe Bedeutung für die Muskelkontraktionen im Magen einer Maus zugeschrieben. Seine Hauptfunktion wird als eine Art Backup-System gesehen, falls es zu einer Dysfunktion in der Signaltransduktionskaskade des M3R kommen sollte, welcher wesentlich stärker an Muskelkontraktionen beteiligt ist (Braverman et al. 2008).

In manchen Geweben, wie z.B. in Endothelzellen der Gefäße des Corpus cavernosum, kommt es durch eine Aktivierung von muskarinischen Rezeptoren zu einer Synthese von Stickstoffmonoxid und dadurch zu einer Muskelrelaxation (Knispel et al. 1992). In der zirkulären Muskelschicht des Antrum pyloricum der Maus verursacht eine Aktivierung der M2R ebenfalls eine Relaxation der Muskulatur durch die Regulation der Freisetzung von Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (Takeuchi et al. 2006). Das Verteilungsmuster des M2R in den verschiedenen Geweben wurde mittels Immunhistochemie (Dörje et al. 1991, Levey 1993, Takeuchi et al. 2005, Iino und Nojyo 2006), RT-PCR (So et al. 2003) und Ligandenbindung (Giraldo et al. 1987, Gomez et al. 1992) erfasst.

Während Takeuchi et al. (2005) sich auf die Verteilung des M2R und des M4R auf der Plasmamembran von glatten Muskelzellen im Stratum circulare und longitudinale des Ileum der Maus beschränkten, zeigten Iino und Nojyo (2006) die Verteilung im Gastrointestinaltrakt des Meerschweinchens, ebenfalls mit dem besonderen Schwerpunkt auf die Tunica muscularis.

4.1 Verteilung und Bedeutung des M2R in der Tunica muscularis

In dieser Arbeit wurde erstmalig das gesamte Magen-Darm-Rohr der Maus untersucht und dabei eine vollständige Übersicht über die zelluläre Verteilung des M2R in den einzelnen Organabschnitten erfasst und diese miteinander verglichen. Dabei verwendeten wir den gleichen M2R Antikörper wie bei den oben genannten Arbeiten (Takeuchi et al. 2004, Iino und Nojyo 2006). Wir konnten nachweisen, dass in allen Organabschnitten die in der Tunica muscularis gelegenen glatten Muskelzellen eine deutliche Immunreaktivität für den M2R aufweisen. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten unterschied sich nur die Tunica muscularis des Ösophagus von den übrigen Abschnitten des Magen-Darm-Kanals. Dort besteht die Tunica muscularis weitestgehend aus quergestreiften und nicht aus glatten Muskelzellen. Alle in der Tunica muscularis des Ösophagus vorkommenden glatten Muskelzellen waren auch immunreaktiv für den M2R-Antikörper. Diese lagen vereinzelt und kamen vermehrt im Stratum circulare vor. Glatte Muskelzellen kommen aufgrund der embryonalen Entwicklung nur vereinzelt in der Tunica muscularis vor. Der Entstehungsmechanismus der sich dort bildenden Skelettmuskulatur wird kontrovers diskutiert. Es gibt Arbeitsgruppen, welche die These vertreten, dass die Tunica muscularis aus glatten Muskelzellen besteht, welche sich in quergestreifte Skelettmuskelzellen umwandeln (Patapoutian et al. 1995, Stratton et al. 2000), während andere einen Untergang durch Apoptose und eine Neubildung der Skelettmuskelfasern aus Myoblasten annehmen (Wörl und Neuhuber 2005). Diese Umwandlung verläuft von kranial nach kaudal und von der äußeren Muskelschicht zur inneren. Andere Untersuchungen zeigten jedoch, dass mesenchymale Vorläuferzellen beider Muskelarten in Zellclustern bereits vorliegen und in der frühen fötalen Entwicklung die Anzahl der Skelettmuskelzellen zunimmt, während es zu einer Reduzierung der glatten Muskulatur kommt (Zhao und Dhoot 2000). Diese liegen nicht in der Nähe der Mikrovaskulatur, sondern unmittelbar benachbart mit ICC (Rishniw et al. 2007), welche als Schrittmacherzellen des Gastrointestinaltraktes gelten. Die in den ICC ausgelösten Aktionspotenziale werden zu benachbarten Muskelzellen weitergeleitet und dadurch eine spontane lokale Muskelkontraktion verursacht. Auf diesem Weg haben sie einen großen Einfluss auf die Peristaltik. In beiden Muskelschichten der Tunica muscularis im Ösophagus des Meerschweinchens zeigte sich keine Immunreaktion für den M2R (Iino und Nojyo 2006). Erst im Bereich des Ösophagussphinkters wurde eine schwache Markierung von glatten Muskelzellen aufgefunden, während Nervenzellen und ICC nicht markiert wurden. Die ausschließlich aus glatten Muskelzellen bestehende Tunica muscularis des übrigen Magen-Darm-Kanals war für den M2R-Antikörper deutlich immunreaktiv.

Es ist bekannt, dass der M2R in der Muskelkontraktion im Magen eine wichtige Rolle spielt. Physiologische Untersuchungen zeigten, dass die Kontraktionskraft von Magenabschnitten in M2R-gendefizienter Mäuse deutlich reduziert ist, im Fundus von M2R- und M4R-gendefizienten Mäusen um 50% (Stengel et al. 2000). Die maximale durch den M2R eingeleitete Kontraktionskraft beträgt gegenüber dem M3R nur ca. 44% (Braverman et al. 2008). Im Ileum der Maus zeigte sich, dass der M2R einen modulatorischen Effekt hat, während der M3R hauptverantwortlich für die Kontraktionsstärke ist (Matsui et al. 2003). Das Populationsverhältnis in der glatten Muskulatur steht im Gegensatz zur Kontraktionskraft. Etwa 80% der muskarinischen Rezeptoren sind vom M2R-Typ und nur ca. 20% vom M3R-Typ (Ehlert et al. 1997, Eglen et al. 2001, So et al. 2003). Carbachol-induzierte Muskelkontraktionen in isolierten Fundus- und Antrumabschnitten sind in M2R/M3R knockout Mäusen weitestgehend verschwunden (Matsui et al. 2002). Trotzdem war die Magenentleerung im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert, was auf einen nicht-cholinergen Kompensationsmechanismus hindeutet (Matsui et al. 2004, Kitazawa et al. 2007). Alle gendefizienten Mäuse waren lebensfähig und zeigten keine peristaltischen Störungen im Magen-Darm-Trakt. Auch histologische Untersuchungen des Magens, des Jejunums und des Ileums zeigten keine Unterschiede (Matsui et al. 2002). Eine kompensatorische Veränderung in der Expression der anderen muskarinischen Rezeptoren wurde bisher nur für das Gehirn der Maus beobachtet (Gomez et al. 1999). Lindeström untersuchte 2002 mittels Immunhistochemie die nervale Versorgung des Pylorus der Ratte und kam zu dem Ergebnis, dass die Magenentleerung durch eine Vielzahl von intrinsischen und extrinsischen Nervenfasern, Hormonen und ICC reguliert wird (Lindenström und Ekblad 2002). Ähnliche Ergebnisse gibt es auch für den Pylorussphinkter des Meerschweinchens (Yuan et al. 2001). Im Magenfundus und in der Pylorusregion sowie im gesamten Dünn- und Dickdarm zeigte sich eine deutliche Immunreaktion für den M2R in der glatten Muskulatur des Stratum circulare und longitudinale der Tunica muscularis. Unterschiede in der Signalstärke waren nicht erkennbar. In der Fundus-, Corpus- und Pylorusregion des Meerschweinchens fanden Iino und Nojyo 2006 ebenfalls eine deutliche Immunreaktion für den M2R in der Tunica muscularis, mit Ausnahme einer Zellreihe im Stratum circulare direkt unterhalb der Tunica submucosa, welche nur sehr schwach oder gar nicht immunreaktiv war. Takeuchi et al. zeigten 2005 eine Immunreaktion für den M2R-Antikörper in den glatten Muskelzellen des Ileums der Maus und darüber hinaus auch in Nervenzellen des enterischen Nervensystems, wo eine Co-Lokalisation mit dem M4R registriert wurde. Dort sind sie für die Regulierung der Acetylcholinfreisetzung verantwortlich. Im Verdauungstrakt des Meerschweinchens war der M2R in den einzelnen Abschnitten

unterschiedlich stark exprimiert. Während im Magenfundus und Corpus beide Muskelschichten der Tunica muscularis ein gleichstarkes Signal für den M2R zeigten, war die zirkuläre Muskelschicht des Pylorus nicht nur stärker als die longitudinale markiert, sondern auch stärker als die im Fundus und Corpus. Im Duodenum, Jejunum und Ileum hingegen war die Zelloberfläche der glatten Muskelzellen gleichmäßig deutlich markiert. Zusätzlich erbrachte eine Doppelimmunfluoreszenz mit einem Anti-Neurokinin 1-Rezeptor Antikörper eine Doppelmarkierung mit ICC im Plexus myentericus. Im Caecum waren beide Muskelschichten deutlich für den M2R immunreaktiv. In den proximalen Colonabschnitten war die Immunreaktion in der Tunica muscularis schwach ausgeprägt, im distalen Colon und Rektum wiederum deutlich, aber nur im proximalen Colon wurde eine Co-Lokalisation mit dem Neurokinin 1-Rezeptor beobachtet (Iino und Nojyo 2006). Zu einer ähnlichen Markierung der Tunica muscularis mit unterschiedlicher Intensität kamen Buckley und Burnstock (1984) mittels Rezeptor-Autoradiographie. Dort zeigte die Tunica muscularis des Ileumabschnittes die stärkste Markierung, gefolgt vom Colon und dem Caecum. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass der verwendete M2R-Antikörper glatte Muskelzellen der Tunica muscularis des gesamten Verdauungstrakts der Maus markiert. Eine unterschiedlich starke Markierung in den Organabschnitten konnte nicht festgestellt werden. Im Ösophagus sind die dort aufgrund der embryonalen Entwicklungsgeschichte nur vereinzelt in der Tunica muscularis gelegenen glatten Muskelzellen ebenfalls deutlich immunreaktiv.

4.2 Verteilung und Bedeutung des M2R in der Tela submucosa

In unseren Untersuchungen konnten wir keine M2R-Immunreaktivität auf den Gefäßmuskelzellen, welche durch den α -SMA-Antikörper markiert werden, auffinden. Ebenso wurden die Endothelzellen dieser Gefäße nur durch den PECAM-1-Antikörper markiert. Auch in den übrigen untersuchten Verdauungstraktabschnitten konnte keine Immunreaktion für den M2R an der Gefäßmuskulatur oder den Endothelzellen aufgefunden werden. Vergleichbare Arbeiten, welche die Verteilung des Rezeptors mittels Immunhistochemie untersuchten (Takeuchi et al. 2005, Iino und Nojyo 2006, Harrington et al. 2010), beschrieben ebenfalls keine Immunreaktion an der muskulären Gefäßwand oder an Endothelzellen. Im Gegensatz dazu gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass die in der Tela submucosa gelegenen Arteriolen unter dem direkten Einfluss von cholinergen Neuronen des Plexus submucosus stehen und dass eine durch Acetylcholin induzierte Vasodilatation durch den M3R vermittelt wird (Neild

et al. 1990). Durch den Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) kann er eine Relaxation der Muskelwand bewirken (Eglen und Whiting 1990). In dieser Arbeit konnte der M2R nicht in der Tela submucosa nachgewiesen werden, was auf eine hauptsächlich durch den M3R gesteuerte cholinerge Durchblutungsregulierung hindeutet.

4.3 Verteilung und Bedeutung des M2R in der Tunica mucosa

4.3.1 Lamina muscularis mucosae

Der Distribution des M2R in der Lamina muscularis mucosae des Verdauungstraktes wurde bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt, was vermutlich auf ihre geringe Bedeutung für die Peristaltik zurückzuführen ist. In unserer Untersuchung in der Maus existieren deutliche Unterschiede sowohl in der muskulären Ausprägung dieser Schicht als auch in der Signalstärke der Immunmarkierung mit dem M2R-Antikörper in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Kanals. Im Fundus und Pylorus war sie in mehreren Zellschichten deutlich ausgeprägt, im Duodenum und Jejunum war sie nicht vorhanden. Erst im Ileum konnte wieder eine dünne, mit dem α -SMA-Antikörper markierte Lamina muscularis mucosae identifiziert werden. Ebenso war sie im Caecum nur schwach ausgeprägt. Im Bereich des Colons bestand wieder eine mehrschichtige, durch den α -SMA-Antikörper deutlich angefärbte Lamina muscularis mucosae. Auch die Markierung mit dem M2R-Antikörper unterschied sich in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Kanals. Im Ösophagus war die Lamina muscularis mucosae deutlich ausgeprägt und von einer Vielzahl von kleinen Gefäßen durchzogen, deren Endothelzellen nur durch den PECAM-1-Antikörper markiert waren. Die glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae exprimierten keinen M2R. Im Gegensatz dazu war sie im Fundus und Pylorus des Magens schwach mit dem M2R-Antikörper angefärbt. Im Vergleich dazu war die Lamina muscularis mucosae in den jeweiligen Abschnitten im Meerschweinchen nicht immunreaktiv (Buckley und Burnstock 1984, Iino und Nojyo 2006). In der Maus konnten wir sie dünn und ohne Immunreaktion für den M2R-Antikörper im Ileum erneut nachweisen. Dies stimmt mit der Untersuchung von Takeuchi et al. (2005) überein, der ebenfalls keine Markierung der Lamina muscularis mucosae mit dem M2R-Antikörper nachweisen konnte. Im Bereich des Caecums bestand ebenfalls keine Markierung der dünn ausgeprägten Lamina muscularis mucosae. Erst im Colon war sie wieder mehrschichtig aufgebaut und durch den M2R-Antikörper deutlich markiert. Ein ähnliches Ergebnis zeigten die

bereits oben genannten Untersuchungen am Meerschweinchen. Dort war die Lamina muscularis mucosae im Dünndarm ebenfalls nicht durch den M2R-Antikörper markiert, erst in der Schleimhaut des Colons und Rektums (Buckley und Burnstock 1984, Iino und Nojyo 2006) zeigte sich eine Immunreaktion, wobei dort nur die longitudinal verlaufenden Muskelzellen markiert waren, während die zirkulären unmarkiert blieben. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Verteilung des M2R in den glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae des Verdauungstraktes lässt auf eine unterschiedliche Regulierung schließen. Während sie im Magen sowie im Colon cholinerg mittels M2R innerviert wird, scheint sie im Ösophagus und Caecum entweder durch andere MR-Subtypen oder durch nicht-cholinerge Neurotransmitter gesteuert zu sein. In der Lamina muscularis mucosae im Magen und im proximalen Colon des Hundes konnten bereits eine Vielzahl von Neuropeptiden (vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Substanz P, Bombesin) nachgewiesen werden, während eine cholinerge Innervation nur sehr gering bzw. nicht vorhanden war (Angel et al. 1984, Ishikawa und Ozaki 1997). Im proximalen Colon des Meerschweinchens konnten ebenfalls immunhistochemisch Neuropeptide (Tachykinine), welche die Muskelmotorik der Lamina muscularis mucosae beeinflussen, identifiziert werden. Im gleichen Tier konnte in der glatten Muskulatur der Lamina muscularis mucosae neben exzitatorisch wirkenden muskarinischen auch inhibitorische Adrenozeptoren nachgewiesen werden (Ohkawa 1980). Im Duodenum der Ratte vermitteln Purinrezeptoren vom Subtyp P2X und P2Y eine Muskelkontraktion (Johnson et al. 1996). Dass die Innervation der Lamina muscularis mucosae vom Ösophagus bis zum Colon im gleichen Tier, wie auch in verschiedenen Tiermodellen (Meerschwein, Ratte, Opposum, Katze und Hund) differieren kann, zeigten Uchida und Kamikawa (2007). Auch variiert sie von der Innervation der Tunica muscularis. Wie anfänglich bereits erwähnt, ist eine genauere Differenzierung der Regulierung der motorischen Muskelaktivität der Lamina muscularis mucosae in Anbetracht der regionalen Unterschiede bisher nicht erfolgt.

4.3.2 Lamina propria mucosae

In der Lamina propria mucosae konnten wir den M2R, mit Ausnahme des Ösophagus, in allen übrigen Abschnitten des Verdauungstraktes im subepithelialen Bereich nachweisen. Während glatte Myozyten der Muskelpumpe nur durch den α -SMA-Antikörper markiert wurden, konnte eine Co-lokalisation von M2R- und PECAM-1-Immunreaktivität nachgewiesen werden.

Im Magen zeigten sich Endothelzellen im subepithelialen Kapillarnetz für den M2R positiv. Zellen der Muskelpumpe, Gefäßmuskulatur in der Tunica submucosa oder deren Endothelzellen exprimierten keinen M2R. Es bestand kein Unterschied in der morphologischen Verteilung oder der Signalstärke für beide untersuchten Magenabschnitte. Im gesamten Dünndarm fanden sich, wie im Magen, ebenfalls M2R exprimierende Endothelzellen des subepithelialen Kapillarnetzes. Gleiches gilt für die Dickdarmabschnitte Caecum und Colon. Mit dem PECAM-1-Antikörper identifizierte Endothelzellen in den subepithelialen Gefäßschleifen im Magen und im Dickdarm sowie in der Spitze der Villi des Dünndarmes zeigten die Expression des M2R.

Erste Veröffentlichungen zur Bedeutung von Endothelzellen in der acetylcholin-abhängigen Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen zeigten bereits Furchgott und Zawadzki (1980). In der Aorta descendens des Kaninchens vermittelten muskarinischen Rezeptoren nur dann eine acetylcholinabhängige Vasodilatation, wenn das Endothel der isolierten Gefäßabschnitte nach der Präparation noch intakt war (Furchgott und Zawadzki 1980, Furchgott 1984). In bisherigen Veröffentlichungen, die an verschiedenen Tiermodellen mittels Immunhistochemie die morphologische Verteilung des M2R in Verdauungsabschnitten untersucht haben, ist nicht über eine Expression des M2R an der Oberfläche von Endothelzellen berichtet worden (Takeuchi et al. 2004, Iino und Nojyo 2006, Harrington et al. 2008 und 2010). Im Gegensatz dazu existieren bereits Veröffentlichungen zum Vorkommen und Funktion von muskarinischen Rezeptoren in Hirngefäßen. Pharmakologische Studien haben den M1R, den M3R und den M5R in den Endothelzellen der Mikrovaskulatur des menschlichen und des Rindergehirns nachgewiesen (Linville und Hamel 1995). Weitere Untersuchungen humaner Hirngefäße wiesen hauptsächlich den M2R und den M5R sowie gelegentlich den M1R auf Endothelzellen nach, während in glatten Muskelzellen mit Ausnahme des M4R alle muskarinischen Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. In Astrogliazellen konnten alle fünf muskarinischen Rezeptoren identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die kortikale Durchblutung als auch die Gefäßpermeabilität durch die neuronale Freisetzung von Acetylcholin beeinflusst werden (Garcia-Villalon et al. 1991, Elhusseiny et al. 1999). Dabei nimmt

die Anzahl der muskarinischen Rezeptoren entlang des intracerebralen Gefäßbaumes der Ratte von den großen Gefäßen bis zu den Arteriolen ab (Badaut et al. 1997). Im Vergleich dazu konnte mittels Autoradiographie in der Pulmonalarterie und der Aorta des Kaninchens und der Katze lediglich in der glatten Muskulatur und nicht in den Endothelzellen muskarinische Rezeptoren nachgewiesen werden (Summers et al. 1987, Stephenson et al. 1988). Dies kann mit den Eigenschaften des verwendeten Liganden sowie mit regionalen Unterschieden der Arterienproben erklärt werden, da bereits kurze Zeit später im Endothel humaner Cerebralarterien muskarinische Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Tsukahara et al. 1989). Im Verdauungstrakt wurde bislang der Dünndarm des Meerschweinchens untersucht. Dort wurde nachgewiesen, dass aus dem Plexus submucosus freigesetztes Acetylcholin Endothelzellen der in der Submucosa gelegenen Gefäße erreicht und dort durch eine Stickstoffmonoxidfreisetzung eine Gefäßdilatation bewirkt (Andriantsitohaina und Surprenant 1992). In der Tunica submucosa gelegene Arterien werden durch cholinerge Neurone aus dem Plexus submucosus gesteuert, die durch Acetylcholinfreisetzung eine Vasodilatation bewirken. Der aktivierte Rezeptor ist vom M3R-Typ und liegt auf den Endothelzellen sowie auf der glatten Gefäßmuskulatur (Neild et al. 1990, Bungardt et al. 1992). Ebenfalls konnte für den M3R in Arterien der Cutis, der quergestreiften Muskulatur und in renalen Interlobärarterien der Maus eine acetylcholinabhängige Vasodilatation nachgewiesen werden (Gericke et al. 2011). Kummer und Haberberger teilten das cholinerge Gefäßsystem in ein intrinsisches und extrinsisches, wobei die Endothelzellen als intrinsischer Teil den Basaltonus einstellen, während perivaskuläre Axone über Transmitter die Feinregulierung veranlassen (Kummer und Haberberger 1999).

In unserer Studie konnte erstmals der M2R in Endothelzellen des subepithelialen Kapillarnetzes im Verdauungstrakt nachgewiesen werden. Aufgrund des konzentrierten Vorkommens des Rezeptors an der apikalen Gefäßschleife lässt sich auf eine Durchblutungsregulation des epithelnahen Mukosabereiches schließen, was direkte Auswirkungen auf wichtige Prozesse der Homöostase hat, wie z.B. die Resorption von intestinaler Flüssigkeit, die Absorption von Makromolekülen, die Sekretion oder die Migration von immunkompetenten Zellen (Schneider und Siska 2003). Des Weiteren können der transepitheliale und der transzelluläre Transport beeinflusst werden (Bijlsma et al. 1996). Auf dem Colonepithel der Ratte wurden bereits muskarinerge Rezeptoren nachgewiesen (Rimele und Gaginella 1982). Insbesondere für den M3R konnte eine erhöhte transzelluläre Transportrate von Makromolekülen durch intestinales Epithel des Menschen und der Maus nachgewiesen werden (Cameron und Perdue 2007). Im Ösophagus sind Endothelzellen der in einer Vielzahl vorkommenden

Gefäße in der Lamina propria nur durch den PECAM-1-Antikörper markiert. Hier existiert keine Immunreaktion für den M2R-Antikörper. Da in diesem Darmabschnitt im Gegensatz zu den anderen keine Resorption erfolgt, liegt die Annahme nahe, dass die subepitheliale M2R-Expression in Kapillarendothelien des Magens und weiter aboral im Zusammenhang mit Permeabilitäts- und Transportregulation steht.

4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Verteilungsmuster in den einzelnen Organabschnitten

Mit Ausnahme des Ösophagus ist das Verteilungsmuster in den hier untersuchten Verdauungstraktabschnitten vom Magen (Fundus und Pylorus) über den Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) bis zum Dickdarm (Caecum und Colon descendens) fast identisch. Beide glatten Muskelzellschichten der Tunica muscularis (Stratum circulare und longitudinale) sind deutlich für den M2R immunreaktiv. In der Tela submucosa gelegene glatte Gefäßmuskulatur exprimiert den M2R nicht. Die subepithelial gelegenen M2R exprimierenden Endothelzellen kommen ebenso in den genannten Abschnitten vor, wobei die Anzahl in den beiden Dickdarmabschnitten im Vergleich zu den vorherigen Anteilen reduziert erscheint. Der einzige deutliche Unterschied liegt in der Ausprägung sowie der Signalstärke der Immunmarkierung mit dem M2R-Antikörper für die Lamina muscularis mucosae. Während sie im Fundus und Pylorus des Magens mehrschichtig aufgebaut und schwach durch den α -SMA-Antikörper und den M2R-Antikörper markiert wird, fehlt sie im Duodenum und Jejunum vollständig. Im Ileum und Caecum war sie dünn-schichtig und ohne Immunreaktion für den M2R nachzuweisen. Im Colon wiederum bestand eine mehrschichtige und für den M2R positive Lamina muscularis mucosae. Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulierung der Lamina muscularis mucosae in den jeweiligen Organabschnitten hin. Im Duodenum und Jejunum könnte sie entweder cholinerg von anderen MR-Subtypen gesteuert oder nicht-cholinerg, z.B. durch Peptide, innerviert werden. Letzteres wurde für die Lamina muscularis mucosae des proximalen Colons des Hundes nachgewiesen wurde (Angel et al. 1984). Anders war das Verteilungsmuster im Ösophagus, was zu einem Großteil auf dessen Entwicklungsgeschichte zurückzuführen ist. Die Tunica muscularis besteht bei der Maus im erwachsenen Tier nicht aus glatter, sondern aus quergestreifter Muskulatur, in der vereinzelt noch glatte Muskelzellen liegen. Diese Muskelzellen waren sowohl für den α -SMA-Antikörper als auch für den M2R-Antikörper positiv. Dort zeigten Endothelzellen in der Tela submucosa, glatte Gefäßwandmuskulatur oder die mehrschichtig ausgeprägte Lamina muscularis mucosae keine M2R-Immunreaktion.

4.5 Magenvergrößerung bei M2R-Gendefizienz

Wir konnten eine signifikante Gewichtszunahme des Magengewichtes bei M2R KO-Mäusen nachweisen. Beim Vergleich des Körpergewichtes der Altersgruppen zeigte sich für beide Gruppen ein höheres Körpergewicht der M2R Wildtypmäuse, wohingegen die M2R KO-Mäuse ein höheres Magengewicht aufwiesen. Auch hier zeigte sich, dass sowohl bei den Jungtieren als auch bei den älteren Tieren ein signifikanter Unterschied im relativen Magengewicht bestand, da jeweils der Magen in der KO-Gruppe im Verhältnis zum Körpergewicht deutlich schwerer war. Innerhalb der Wildtypgruppe bestand ein gleichmäßiges Organwachstum, wohingegen ein signifikanter Wachstumsunterschied im Verhältnis des Magengewichtes zum Körpergewicht bei den Knockouttieren existierte, da hier der Magen im Verhältnis zum Körpergewicht deutlich schwerer wurde.

Bisherige Veröffentlichungen beschrieben ebenfalls morphologische Unterschiede im makroskopischen und mikroskopischen Bereich für andere Tiermodelle. So beschrieben Abel et al. (2004) bereits makroskopisch einen aufgebläht wirkenden Magen in GTPCH/BH4 (GTP-cyclohydrolase I/Tetrahydrobiopterin) gendefizienten Mäusen (hph-1 KO-Mäuse). Das Körpergewicht der KO-Tiere war geringer und die einzelnen Muskelschichten (Stratum circulare und longitudinale, Lamina muscularis mucosae) des Pylorus waren dicker als in der Kontrollmaus. Diese Unterschiede waren bereits bei zehn Tage alten Tieren zu messen, verschwanden aber bei Tieren, welche 180 Tage alt waren (Abel et al. 2004). Die Autoren führten dies entweder auf einen Pylorusspasmus aufgrund einer reduzierten Bereitstellung von Stickstoffmonoxid und dadurch sekundär auf eine Muskelhypertrophie, oder auf eine primär bestehende Entwicklungsanomalie zurück. Auch für neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase gendefiziente Mäuse zeigte sich makroskopisch ein vergrößerter Magen mit Hypertrophie des Pylorus und des Stratum circulare im Vergleich zum Wildtyp, während Dünn- und Dickdarm keinen Unterschied zeigten. Untersucht wurden Tiere in einem wöchentlichen Abstand in einem Zeitraum zwischen der 4. und 24. Woche. Ebenso konnte histologisch eine Dilatation des Stratum circulare nachgewiesen werden (Huang et al. 1993).

Desgleichen existieren Untersuchungen zur körperlichen Entwicklung von M3R KO-Mäusen. Deren Wachstum war bis zum Alter von zwei Wochen normal, während es anschließend signifikant vermindert war, und es bereits bei fünf Wochen alten Tieren ca. um die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp reduziert war (Matsui et al. 2004). Einige der Knockoutjungtiere wurden krank und verstarben. Im Alter von 15 Wochen war das Körpergewicht allerdings wieder ähnlich, jedoch waren die weiblichen M3R KO-Mäuse

kleiner als die des Wildtyps. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine weitere Studie mit M3R KO-Mäusen (Yamada et al. 2001). Auch hier war das Wachstum in der ersten postnatalen Woche identisch mit dem des Wildtyps. Bei weiblichen Tieren kam es ab der zweiten, bei männlichen Tieren ab der dritten Woche zu Gewichtsunterschieden. In der 22. Woche nach Geburt betrug der durchschnittliche Gewichtsunterschied zwischen den KO- und den Wildtyp-Tieren 22%, welcher bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (>1 Jahr) persistierte. Innerhalb dieser Studie wurde ein Unterschied in der Nahrungsaufnahme festgestellt. M3R KO-Tiere nahmen ca. 30% weniger Kalorien zu sich. Ein hemmender Einfluss durch eine verminderte Speichelsekretion konnte ebenso ausgeschlossen werden wie eine gastrointestinale Störung. Aufgrund der gewonnenen Daten führen die Autoren den Gewichtsverlust der M3R KO-Mäuse auf eine Verminderung der Appetit regulierenden Hormone (z.B. Leptin) zurück. Eine ca. 5%ige Gewichtsreduktion, welche aber nicht signifikant war ($P \geq 0,05$), wurde bereits für erwachsene M2R KO-Mäuse beschrieben (Gomez et al. 1999). In dieser Studie wurde kein morphologischer Unterschied in der allgemeinen Gesundheit, der Lebensdauer und der Fertilität im Vergleich zu den Wildtypmäusen festgestellt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam es auch bei der Untersuchung von M2R/M3R Doppelknockoutmäusen (Matsui et al. 2002). Auch dort zeigten sich histologisch keine Auffälligkeiten in Magen-, Jejunum- und Ileumpräparaten. Auch andere Organe wie Herz, Lunge und Niere erschienen unauffällig. Eine Magenüberdehnung oder eine Obstipation wurden nicht beobachtet. Keine wesentliche Änderung der Magenentleerungsrate wurde auch bei funktionellen Untersuchungen bei M2R/M3R Knockoutmäusen gemessen (Kitazawa et al. 2007).

Die hier erhobenen Daten zeigen einen signifikanten Unterschied im Quotienten aus dem Magengewicht und dem Körpergewicht zwischen Wildtyp- und M2R KO-Mäusen. Aufgrund der Fragestellung und des daraus resultierenden Studienaufbaues sowie der Verwendung der gemessenen Mäusemägen für physiologische Versuche bzw. der reinen Datenerfassung des Magen- und Körpergewichtes bei pulmonologischen Untersuchungen erfolgte keine feinhistologische Vermessung der einzelnen Muskelschichten. Makroskopisch zeigten sich, wie bereits beschrieben, aufgeblähte Magenverhältnisse. Auf allen histologisch erfassten Abschnitten des Verdauungstraktes zeigten sich orientierend keine augenscheinlichen Variationen der einzelnen Muskelschichten. Leider fehlen hier genauere Untersuchungen. Aufgrund der Regulierung der Magenentleerung durch eine Vielzahl von Neurotransmittern, extrinsischen und intrinsischen Nervenfasern, Hormonen und ICC kann das Fehlen der kontraktionsvermittelnden M2R/M3R vermutlich kompensiert werden (Yuan et al. 2001, Lindenström und Ekblad 2002). Das Ileum von weiblichen M2R/M3R KO-Mäusen

zeigte bei Untersuchungen mit elektrischer Feldstimulation eine stärkere nicht-cholinerge Kontraktion als im Wildtyp. Dies lässt auf eine veränderte Regulierung von nicht-cholinergen Kompensationsmechanismen schließen (Matsui et al. 2002). Somit kann die gastrointestinale Motilität aufrecht erhalten werden. Das verminderte Körpergewicht kann auf eine zentrale Störung der Appetitregulierung zurückgeführt werden (Yamada et al. 2001). Das erhöhte Magengewicht bei den gendefizienten Tieren bleibt aber ungeklärt. Eine Hypertrophie der Magenmuskulatur, wie bereits in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen, wäre hierfür der schlüssigste Grund (Huang et al. 1993, Abel et al. 2004). Darüber kann diese Studie keine Hinweise liefern. Ebenso sind in bisherigen Studien mit muskarinischen Knockouttieren (Maus) keine makroskopischen und mikroskopischen Auffälligkeiten beschrieben worden, so dass die Ursache für diesen hochsignifikanten Magengewichtsunterschied unklar bleibt. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist dieser Umstand multifaktoriell bedingt. Ein Grund könnte eine veränderte hormonelle Kontrolle der Energiehomöostase sein. So wurde bei M3R KO-Mäusen ein verminderter Leptinspiegel gemessen. Die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) zeigten keinen Unterschied im Vergleich von KO- und Wildtypmäusen (Yamada et al. 2001). Auch eine veränderte Körperkerntemperatur ließe ein geringeres Gesamtgewicht erklären. So spielen muskarinische Rezeptoren, insbesondere der M2R, eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Körpertemperatur (Gomez et al. 1999). Für M3R-KO Mäuse konnte eine 30% geringere Kalorienaufnahme als bei der Wildtypgruppe gemessen werden, wobei der Speichelfluss als limitierender Faktor für die Aufnahme von Trockenfutter ausgeschlossen werden konnte, so dass als Ursache eine veränderte zentrale Appetitregulation vermutet wurde (Yamada et al. 2001). Histologisch konnte für den Gastrointestinaltrakt von M2R/M3R KO-Mäusen kein relevanter Unterschied im Vergleich zur Wildtypmaus festgestellt werden (Matsui et al. 2002). Auch eine Pylorusstenose konnte ausgeschlossen werden, da die Magenentleerungsraten sowohl bei M2R- als auch bei M3R KO-Mäusen nicht verändert waren (Yamada et al. 2001, Kitazawa et al. 2007). Obwohl die gerade genannten Studien eine veränderte Magenmotilität ausschließen, wären eine veränderte Peristaltik mit Pylorushypertrophie bzw. Pylorusspasmus die Faktoren, die sowohl das erhöhte Magengewicht als auch das verminderte Körpergewicht erklären würden. Zum Teil könnte der gemessene Gewichtsunterschied aus dem veränderten Vormagen resultieren. Wie die makroskopischen Bilder zeigen, ist dieser hypertrophiert und erscheint gebläht, während die Pylorusregion nicht wesentlich verändert erscheint.

5. Zusammenfassung

Muskarinische Rezeptoren vermitteln in verschiedensten Organen die Wirkung des Neurotransmitters Acetylcholin. Im Gastrointestinaltrakt, wo der Subtyp M2R überwiegt, regulieren sie die Kontraktion glatter Muskelzellen und sind somit im Focus für therapeutische Ansätze zur Behandlung von Störungen, wie z.B. dem Reizdarmsyndrom. In dieser Arbeit zeigten wir die zelluläre Verteilung des M2R im Verdauungstrakt der Maus. Gewebeproben vom Ösophagus bis zum Colon descendens wurden mit dem etablierten Verfahren der Immunhistochemie untersucht. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der sich an Proben entsprechend gendefizienter (KO) Tiere als spezifisch erwies. Zusätzlich erfassten wir von M2R KO-Mäusen und deren korrespondierenden Wildtypen das Körper- und Magengewicht. Das Körpergewicht der M2R KO-Tiere war erniedrigt und das Magengewicht insbesondere in Relation zum Körpergewicht erhöht. Makroskopisch zeigte sich ein geblähter Magen. Trotz der Bedeutung des M2R für die Muskelkontraktion im Verdauungstrakt wurden für M2R KO-Tiere bisher keine funktionalen krankhaften Magen-Darm Veränderungen oder Unterschiede im histologischen Bild beschrieben. Wir konnten das Vorkommen des M2R in der glatten Muskulatur der Tunica muscularis des Verdauungstraktes bestätigen. Im Ösophagus, dessen Tunica muscularis überwiegend aus Skelettmuskulatur besteht, kamen vereinzelt M2R exprimierende glatte Muskelzellen vor. Die Lamina muscularis mucosae war nur im Magen und im Colon für den M2R positiv. Glatte Muskulatur in der Tela submucosa zeigte keine M2R-Immunreaktivität, obwohl in der Literatur bereits mehrfach eine muskarinische Regulierung der Gefäßwandmuskulatur beschrieben wurde. Des Weiteren zeigten durch den CD 31-Antikörper markierte Endothelzellen dieser Gefäße keine Immunreaktivität für den M2R. Glatte Muskelzellen der Muskelpumpe in der Lamina propria mucosae wurden ebenfalls nicht durch den M2R-Antikörper markiert. Dafür konnte erstmalig der M2R auf Endothelzellen in Kapillaren unmittelbar unter dem Oberflächenepithel vom Magencorpus bis zum Colon descendens nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die glatte Muskulatur der Tunica muscularis des Verdauungstraktes überwiegend cholinerg über den M2R gesteuert wird und darüber hinaus seine Expression an subepithelialen Kapillarendothelien im Magen-Darm-Kanal Einfluss auf mucosale Transportmechanismen hat.

6. Summary

Muscarinic receptors mediate the action of the neurotransmitter acetylcholine upon a variety of organs. The subtype M2R predominates in the gastrointestinal tract. There it regulates the contraction of the smooth muscle cells and is, therefore, an important target for therapeutic approaches, for example the irritable bowel syndrome. The present work addresses the spatial distribution and cellular localization of this receptor in the murine intestinal tract, from the esophagus down to colon descendens, by immunohistochemistry utilizing M2R gene-deficient (KO) mice to validate specificity of immunohistochemical labelling. In addition, body and stomach weight of M2R KO- and wild-type mice were recorded. In M2R KO-mice, stomach weight was increased and body weight was lower. Despite the involvement of M2R in muscle contraction, neither functional nor histological changes were observed in the gastrointestinal tract. Immunohistochemistry validated the occurrence of M2R in the tunica muscularis. Even in the tunica muscularis of the esophagus, which consists mainly of skeletal muscle, M2R-immunoreactive smooth muscle cells were occasionally found. The lamina muscularis mucosae of stomach and colon was positive for M2R. Smooth muscle cells of the tela submucosa did not show any M2R-immunoreactivity even though the literature describes a muscarinic regulation of submucosal vessels. Neither endothelial cells of these vessels, labelled with CD31-antibody, nor smooth muscle cells in the lamina propria mucosae showed M2R-immunoreactivity. However, M2R-labelling was noted for the first time at endothelial cells of capillaries underneath the surface epithelium from the body of the stomach until the colon descendens. The present data suggest that, on the one hand, intestinal smooth muscle cells of the tunica muscularis are mainly under cholinergic M2R control and, on the other hand, that the M2R located on endothelial cells in capillaries under the intestinal surface epithelium may regulate mucosal transport mechanisms.

6. Literatur

Abbas B, Hayes TL, Wilson DJ, Carr KE (1989). Internal structure of intestinal villus: morphological and morphometric observations at different levels of the mouse villus. *Journal of Anatomy* 162:263-273

Abel RM, Dorè CJ, Bishop AE, Facer P, Polak JM, Spitz L (2004). A histological study of the hph-1 mouse mutant: an animal model of phenylketonuria and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 33(3):125-130

Andriantsitohaina R, Surprenant A (1992). Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurons dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium. *Journal of Physiology* 453:493-502

Angel F, Go VL, Szurszewski JH (1984). Innervation of the muscularis mucosae of canine proximal colon. *Journal of Physiology* 357:93-108

Badaut J, Moro V, Seylaz J, Lasbennes F (1997). Distribution of muscarinic receptors on the endothelium of cortical vessels in the rat brain. *Brain Research* 778(1):25-33

Barlow RB, Franks FM, Pearson JDM (1972). A comparison of the affinities of antagonists for acetylcholine receptors in the ileum, bronchial muscle and iris of the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology* 46(2):300-312

Barlow RB, Berry KJ, Glenton PA, Nilolaou NM, Soh KS (1976). A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29 degrees C and in ileum at 29 degrees C and 37 degrees C. *British Journal of Pharmacology* 58(4):613-620

Basile AS, Fedorova I, Zapta A, Liu X, Shippenberg T, Duttaroy A, Yamada M, Wess J (2002). Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99(17):11452-11457

Berdanier CD (2004). *Gastrointestinal System and Metabolism*. Aus: The laboratory mouse. Hedich H, Bullock G (Hrsg.). Elsevier Verlag, London, Kapitel 15, 245-260

Braverman AS, Tallarida RJ, Ruggieri MR Sr. (2008). The use of occupation isoboles for analysis of a response mediated by two receptors: M2 and M3 muscarinic receptor subtype-induced mouse stomach contractions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325(3):954-960

Bijlsma PB, Kiliaan AJ, Scholten G, Heyman M, Groot JA, Taminiau JA (1996). Carbachol, but not forskolin, increases mucosal-to-serosal transport of intact protein in rat ileum in vitro. *The American Journal of Physiology* 271:G147-55.

Buckley N, Burnstock G (1984). Autoradiographic localisation of muscarinic receptors in guinea-pig intestine: distribution of high and low affinity agonist binding sites. *Brain Research* 294(1):15-22

Burgen AS (1995). The background of the muscarinic system, *Life Sciences* 56(11-12):801-806

Bungardt E, Vockert E, Feifel R, Moser U, Tacke R, Mutschler E, Lambrecht G, Surprenant A (1992). Characterization of muscarinic receptors mediating vasodilatation in guinea-pig ileum submucosal arterioles by the use of computer-assisted videomicroscopy. *European Journal of Pharmacology* 213(1):53-61

Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J (2003). Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochemical Research* 28(3-4):437-442

Cameron HL, Perdue MH (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterology and Motility* 19(1):47-56

Caulfield MP (1993). Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. *Pharmacology and Therapeutics* 58(3):319-379

Caulfield MP, Birdsall NJ (1998). International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews* 50(2):279-290

Cook HJ (1984). Influence of enteric cholinergic neurons on mucosal transport in guinea pig ileum. *The American Journal of Physiology* 246:G263-G267

Costa M, Brookers SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75(3):949-967

Dörje F, Levey AI, Brann MR (1991). Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Molecular Pharmacology* 40(4):459-462

Drenckhahn D (2008). Verdauungssystem. Aus: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Benninghoff A, Drenckhahn D (Hrsg.). Elsevier Verlag, München, 17.Auflage, Band 1, Kapitel 7, 585-730

Eglen RM, Whiting RL (1990). Heterogeneity of vascular muscarinic receptors. *Journal of Autonomic Pharmacology* 10(4):233-245

Eglen RM, Choppin A, Dillon MP, Hegde S (1999). Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Current Opinion in Chemical Biology* 3(4):426-432

Eglen RM, Hedge SS, Watson N (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacological Reviews* 48(4):531-565

Eglen RM (2001). Muscarinic receptors and gastrointestinal smooth muscle function. *Life Sciences* 68(22-23):2573-2578

Eglen RM (2006). Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Autonomic and Autacoid Pharmacology* 26(3):219-233

Ehlert FJ, Sawyer GW, Esqueda EE (1999). Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Life Sciences* 64(6-7):387-394

Ehlert FJ (2003). Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sciences* 74(2-3):355-366

Ehlert FJ, Ostrom RS, Sawyer GW (1997). Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sciences* 61(18):1729-1740

Eiden LE (1998). The cholinergic gene locus. *Journal of Neurochemistry* 70(6):2227-2240

Elhousseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic DB, Hamel E (1999). Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19(7):794-802

Elhousseiny A, Hamel E (2000). Muscarinic - but not nicotinic - acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20(2):298-305

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-376

Furchgott RF (1984). The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 24:175-197

Garcia-Villalon AL, Krause DN, Ehlert FJ, Duckles SP (1991). Heterogeneity of muscarinic receptor subtypes in cerebral blood vessels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 258(1):304-310

Gericke A, Sniatecki JJ, Mayer VG, Goloborodko E, Patzak A, Wess J, Pfeiffer N (2011). Role of M1, M3 and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 300(5):1602-1608

Giraldo E, Monferini E, Ladinsky H, Hammer R (1987). Muscarinic receptor heterogeneity in guinea pig intestinal smooth muscle: binding studies with AF-DX 116. *European Journal of Pharmacology* 141(3):475-477

Gómez A, Martos F, Bellido I, Marquez E, Garcia AJ, Pavia J, Sanchez de la Cuesta F (1992). Muscarinic receptor subtypes in human and rat colon smooth muscle. *Biochemical Pharmacology* 43(11):2413-2419

Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J (1999). Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96(18):10483-10488

Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J (1999). Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 96(4):1692-1697

Green EL, Coleman DL, Dagg CP, Fuller JL, Green MC, Kaliss N, Russell ES, Staats J (1966). *Biology of the Laboratory Mouse*. Green EL (Hrsg.). McGraw-Hill, 2.edition, 271-280

Grübler B (2012). Alzheimer-Demenz: Die Forschung steht unter Druck. *Deutsches Ärzteblatt* 109(1-2), B23-25

Günther S, Lierse W (1968). Die Angioarchitektur im Ösophagus des Kaninchens, der Ratte und der Maus. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 40(4):3-22

Haberberger R, Schultheiss G, Diener M (2006). Epithelial muscarinic M1 receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. *European Journal of Pharmacology* 530(3):229-233

Haberberger R, Bodenbenner M, Kummer W (2000). Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochemistry and Cell Biology* 113(5):379-387

Harrington AM, Peck CJ, Liu L, Burcher E, Hutson JM, Southwell BR (2010). Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. *Neurogastroenterology and Motility* 22(9):999-1008

Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR (2008). Immunohistochemical localisation of pre-synaptic muscarinic receptors subtype-2 (M2r) in the enteric nervous system of guinea-pig ileum. *Cell and Tissue Research* 332(1):37-48

Hirota CL, McKay DM (2006). Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology* 149(5):463-479

Hosey MM (1992). Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 6(3):845-852

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75(7):1273-86

Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30:633-673

Iino S, Nojyo Y (2006). Muscarinic M(2) acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* 138(2):549-559

Ishikawa K, Ozaki T (1997). Distribution of several gut neuropeptides and their effects on motor activity in muscularis mucosae of guinea-pig proximal colon. *Journal of the Autonomic Nervous System* 64(2-3):91-100

Johnson CR, Charlton SJ, Hourani SM (1996). Responses of the longitudinal muscle and the muscularis mucosae of the rat duodenum to adenine and uracil nucleotides. *British Journal of Pharmacology* 117(5):823-830

Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W (2009). Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* 379(4):389-395

Kaufmann P, Lierse W, Stark J, Stelzner F (1968). Die Muskelanordnung in der Speiseröhre. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 40(3):3-33

Kitazawa T, Hashiba K, Cao J, Unno T, Komori SI, Yamada M, Wess J, Taneike T (2007). Functional roles of muscarinic M2 and M3 receptors in mouse stomach motility: studies with muscarinic receptor knockout mice. *European Journal of Pharmacology* 554(2-3):212-222

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Höhle KD, Schemann M, Racke K, Wesler I (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 355(4):515-523

Knispel HH, Goessl C, Beckmann R (1992). Nitric oxide mediates relaxation in rabbit and human corpus cavernosum smooth muscle. *Urological Research* 20(4):253-257

Khurana S, Chacon I, Xie G, Yamada M, Wess J, Raufmann JP, Kennedy RH (2004). Vasodilatory effects of cholinergic agonists are greatly diminished in aorta from M3R-/- mice. *European Journal of Pharmacology* 493(1-3):127-132

Komuro T (2006). Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *The Journal of Physiology* 576:653-658

Kurzen H, Schallreuter KU (2004). Novel aspects in cutaneous biology of acetylcholine synthesis and acetylcholine receptors. *Experimental Dermatology* 13:27-30

Kummer W, Haberberger R (1999). Extrinsic and intrinsic cholinergic systems of the vascular wall. *European Journal of Morphology* 37(4-5):223-226

Levey AI (1993). Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sciences* 52(5-6):441-448

Lindeström LM, Ekblad E (2002). Origins and projections of nerve fibres in rat pyloric sphincter. *Autonomic Neuroscience* 97(2):73-82

Linville DG, Hamel E (1995). Pharmacological characterization of muscarinic acetylcholine binding sites in human and bovine cerebral microvessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 352(2):179-186

Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi SI, Manabe T, Taketo MM (2002). Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *Journal of Neuroscience* 22(24):10627-10632

Matsui M, Griffin MT, Shehnaz D, Taketo MM, Ehlert FJ (2003). Increased relaxant action of forskolin and isoproterenol against muscarinic agonist-induced contractions in smooth muscle from M2 receptor knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305(1):106-113

Matsui M, Yamada S, Oki T, Manabe T, Taketo MM, Ehlert F (2004). Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sciences* 75(25):2971-2981

Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo MM (2000). Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(17):9579-9584

McConalogue K, Furness JB (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 8(1):51-76

Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J (2001). Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *The Journal of Neuroscience* 21(14):5239-5250

Morris D (1966). The choline acetyltransferase of human placenta. *The Biochemical Journal* 98(3):754-762

Neild TO, Shen KZ, Surprenant A (1990). Vasodilatation of arterioles by acetylcholine released from single neurones in the guinea-pig submucosal plexus. *Journal of Physiology* 420:247-265

Ohkawa H (1980). Mechanical activity of the smooth muscle of the muscularis mucosa of the guinea pig esophagus and drug actions. *The Japanese Journal of Physiology* 30(2):161-177

Oktay S, Cabadak H, Iskender E, Gören Z, Caliskan E, Orun O, Aslan N, Karaalp A, Tolun A, Ulusoy NB, Levey AI, El-Fakahany EE, Kan B (1998). Evidence for the presence of muscarinic M2 and M4 receptors in guinea-pig gallbladder smooth muscle. *Journal of Autonomic Pharmacology* 18(4):195-204

Olsson C, Holmgren S (2011). Autonomic control of gut motility: a comparative view. *Autonomic Neuroscience* 165(1):80-101

Patapoutian A, Wold BJ, Wagner RA (1995). Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science* 270(5243):1818-1821

Peach MJ, Singer HA, Loeb AL (1985). Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. *Biochemical Pharmacology* 34(11):1867-1874

Pradidarcheep W, Labruyere WT, Dabhoiwala NF, Lamers WH (2008). Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56(12):1099-1111

Pradidarcheep W, Stallen J, Labruyère WT, Dabhoiwala NF, Michel MC, Lamers WH (2009). Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinergic and adrenergic receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379(4):397-402

Qu ZD, Thacker M, Castelucci P, Bagyánszki M, Epstein ML, Furness JB (2008). Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell and Tissue Research* 334(2):147-161

Rimele TJ, Gaginella TS (1982). In vivo identification of muscarinic receptors on rat colonic epithelial cells. Binding of [3H]-quinuclidinyl benzilate, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 319(1):18-21

Rishniw M, Fisher PW, Doran RM, Meadows E, Klein WH, Kotlikoff MI (2007). Smooth muscle persists in the muscularis externa of developing and adult mouse esophagus. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 28(2-3):153-165

Rumessen JJ, Thuneberg L, Mikkelsen HB (1982). Plexus muscularis profundus and associated interstitial cells, II. Ultrastructural studies of mouse small intestine. *The Anatomical Record* 203(1):129-146

Sanders KM, Ward SM (2006). Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *The Journal of Physiology* 576(3):721-726

Schirmer SU, Eckhardt I, Lau H, Klein J, DeGraaf YC, Lips KS, Pineau C, Gibbins IL, Kummer W, Meinhardt A, Haberberger RV (2011). The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction* 142(1):157-166

Schneider FA, Siska IR (2003). Veins and their functions. Aus: *Clinical physiology of the venous system*. Schneider FA, Siska IR, Avram JA (Hrsg.). Kluwer Verlag, Boston, 15. Auflage, Kapitel 2, 11-22

Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomeza J, Basile AS, Alzheimer C, Wess J (2004). M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *The Journal of Neuroscience* 24(45):10117-10127

Slutsky I, Wess J, Gomeza J, Dudel J, Parnas I, Parnas H (2002). Use of knockout mice reveals involvement of M2-muscarinic receptors in control of the kinetics of acetylcholine release. *Journal of Neurophysiology* 89(4):1954-1967

So I, Yang DK, Kim HJ, Min KW, Kang TM, Kim SJ, Kim KW, Park KH, Jeon JH, Choi KH, Kim IG (2003). Five subtypes of muscarinic receptors are expressed in gastric smooth muscles of guinea pig. *Experimental and Molecular Medicine* 35(1):46-52

Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen ML (2000). M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292(3):877-885

Stengel PW, Yamada M, Wess J, Cohen ML (2002). M(3)-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 282(5):1443-1449

Stephenson JA, Gibson RE, Summers RJ (1988). An autoradiographic study of muscarinic cholinceptors in blood vessels: no localization on vascular endothelium. *European Journal of Pharmacology* 153(2-3):271-283

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annual Review of Biochemistry* 63:101-132

Stratton CJ, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM (2000). Ultrastructural analysis of the transdifferentiation of smooth muscle to skeletal muscle in the murine esophagus. *Cell and Tissue Research* 301(2):283-298

Summers RJ, Molenaar P, Stephenson JA, Jones CR (1987). Autoradiographic localization of receptors in the mammalian cardiovascular system. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 14(5):437-447

Takayama I, Horiguchi K, Daigo Y, Mine T, Fujino MA, Ohno S (2002). The interstitial cells of Cajal and gastroenteric pacemaker system. *Archives of Histology and Cytology* 65(1):1-26

Takeuchi T, Toyoshima M, Mukai K, Hagi K, Matsui M, Nakajima H, Azuma YT, Hata F (2006). Involvement of M(2) muscarinic receptors in relaxant response of circular muscle of mouse gastric antrum. *Neurogastroenterology and Motility* 18(3):226-233

Takeuchi T, Fujinami K, Goto H, Fujita A, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Hata F (2005). Roles of M2 and M4 muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. *Journal of Neurophysiology* 93(5):2841-2848

Timmermanns JP, Adriaensen D, Cornelissen W, Scheuermann DW (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118(2):331-340

Tobin G, Giglio D, Lundgren O (2009). Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60(1):3-21

Treuting PW, Valasek MA, Dintzis SM (2012). Upper Gastrointestinal Tract. *Aus: Comparative Anatomy and Histology. A Mouse and Human Atlas*. Treuting PW, Pieper M (Hrsg.). Elsevier Verlag, Amsterdam, 1.Auflage, Kapitel 11, 155-176

Tsukahara T, Kassell NF, Hongo K, Vollmer DG, Ogawa H (1989). Muscarinic cholinergic receptors on the endothelium of human cerebral arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 9(6):748-753

Uchida K, Kamikawa Y (2007). Muscularis mucosae - the forgotten sibling. *Journal of Muscle Research* 43(5):157-177

Uchiyama T, Chess-Williams R (2004). Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *Journal of Smooth Muscle Research* 40(6):237-247

Unno T, Matsuyama H, Izumi Y, Yamada M, Wess J, Komori S (2006). Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology* 149(8):1022-1030

Wess J (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Critical Reviews in Neurobiology* 10(1):69-99

Wess J, Duttaroy A, Zhang W, Gomeza J, Cui Y, Miyakawa T, Bymaster FP, McKinzie L, Felder CC, Lamping KG, Faraci FM, Deng C, Yamada M (2003). M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors and Channels* 9(4):279-290

Wess J (2004). Muscarinic acetylcholine receptor mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annual Review of Pharmacology und Toxicology* 44:423-450

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacology and Therapeutics* 77(1):59-79

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003). The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sciences* 72(18-19):2055-2061

Wörl J, Neuhuber WL (2005). Ultrastructural analysis of the smooth-to-striated transition zone in the developing mouse esophagus: emphasis on apoptosis of smooth and origin and differentiation of striated muscle cells. *Developmental Dynamics* 233(3):964-982

Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J (2001). Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410(6825):207-212

Yuan SY, Costa M, Brookes SJ (2001). Neuronal control of the pyloric sphincter of the guinea-pig. *Neurogastroenterology and Motility* 13(3):187-198

Zhao W, Dhoot GK (2000). Both smooth and skeletal muscle precursors are present in foetal mouse oesophagus and they follow different differentiation pathways. *Developmental Dynamics* 218(4):587-602

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der Mägen von M2R KO- und WT-Mäusen	22
Abbildung 2: Boxplotdarstellung der Körpergewichte beider Mausstämme.....	23
Abbildung 3: Boxplotdarstellung der Magengewichte beider Mausstämme.....	24
Abbildung 4: Boxplotdarstellung des Körpergewicht/Magengewicht-Quotienten beider Mausstämme	25
Abbildung 5: Punktwolke der Magengewichte innerhalb der Mausstämme bei aufsteigendem Alter.....	26
Abbildung 6: Boxplotdarstellung der Körpergewichte der Mausstämme bei den einzelnen Altersgruppen	27
Abbildung 7: Boxplotdarstellung der Magengewichte der Mausstämme bei den einzelnen Altersgruppen	28
Abbildung 8: Boxplotdarstellung des Körpergewicht/Magengewicht-Quotienten bei den einzelnen Altersgruppen	29
Abbildung 9: Ösophagus, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper	31
Abbildung 10: Ösophagus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	32
Abbildung 11: Ösophagus, Stratum cirulare, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	33
Abbildung 12: Ösophagus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA, CLSM-Aufnahme	34
Abbildung 13: Ösophagus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	35
Abbildung 14: Ösophagus, Tunica muscularis, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31), CLSM-Aufnahme	36
Abbildung 15: Magen, Fundus, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper.....	38
Abbildung 16: Magen, Fundus, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA.....	39
Abbildung 17: Magen, Fundus, adluminaler Bereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	40
Abbildung 18: Magen, Fundus, Tunica muscularis, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	41
Abbildung 19: Magen, Fundus, adluminaler Bereiche, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	42
Abbildung 20: Pylorus, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper.....	44

Abbildung 21: Pars pylorica, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	45
Abbildung 22: Pars pylorica, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	46
Abbildung 23: Pars pylorica, lumennaher Mukosabereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA sowie mit M2R und PECAM-1 (CD31), CLSM-Aufnahme	47
Abbildung 24: Duodenum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper	49
Abbildung 25: Duodenum, apikaler Zottenbereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	50
Abbildung 26: Duodenum, apikaler Zottenbereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	51
Abbildung 27: Jejunum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper	52
Abbildung 28: Jejunum, Doppelimmunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen M2R und α SMA	53
Abbildung 29: Jejunum, lumennaher Zottenbereich, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	54
Abbildung 30: Jejunum, Doppelimmunfluoreszenz gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	55
Abbildung 31: Jejunum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	56
Abbildung 32: Ileum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper	57
Abbildung 33: Ileum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	58
Abbildung 34: Ileum, Vergrößerung der adluminalen Zottenabschnitte, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	59
Abbildung 35: Ileum, Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	60
Abbildung 36: Ileum, Vergrößerung aus dem luminalen Zottenbereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)....	61
Abbildung 37: Ileum, Zottenspitzen, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA sowie M2R und PECAM-1 (CD31), CLSM-Aufnahme	62
Abbildung 38: Caecum, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper	63
Abbildung 39: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	64
Abbildung 40: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	65

Abbildung 41: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	66
Abbildung 42: Caecum, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31)	67
Abbildung 43: Colon descendens, Immunfluoreszenz mit dem M2R-Antikörper	69
Abbildung 44: Colon, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	70
Abbildung 45: Colon, Vergrößerung des Oberflächenepithelbereiches, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA	71
Abbildung 46: Colon, Doppelimmunfluoreszenz mit M2R- und PECAM-1 (CD31)- Antikörpern	72
Abbildung 47: Colon, lumennaher Mukosabereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und α SMA, CLSM-Aufnahme	73
Abbildung 48: Colon, lumennaher Mukosabereich, Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen M2R und PECAM-1 (CD31), CLSM-Aufnahme	73

Danksagung

Abschließend möchte ich mich noch bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Kummer, der mich während der Versuchsreihe fachlich unterstützte, später immer wieder geduldig meine Entwürfe korrigierte und mir über den gesamten Zeitraum mit Rat und Tat zur Seite stand. Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der „kardiopulmonalen Neurobiologie“ für die Hilfestellungen in einer unvergesslichen Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Partnerin, die vielleicht zeitweise am Abschluss dieser Arbeit gezweifelt haben, aber ohne deren Unterstützung all das nicht möglich gewesen wäre.

Publikationen

Poster

Leimbach M, Krasteva G, Jositsch G, Haberberger R, Kummer W (2008). Select smooth muscle cell types and endothelial cells of subsurface capillaries in the murine gut mucosa express the muscarinic acetylcholine receptor M2. 25. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg vom 24.09.2008 bis 26.09.2008

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift